

Aufklärung der molekularen Mechanismen des Selektin-vermittelten Leukozytenrollens als Grundlage für eine antiinflammatorische Therapie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Jan Vogel
geb. am 20.06.67 in Mittweida

Gutachter:

1. Prof. Dr. P. Nuhn
2. P.D. Dr. U. Rothe
3. Prof. em. Dr. H. W. Meyer

Halle (Saale), 06.09.2000

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
2. Theoretischer Teil.....	3
2.1. Adhäsionskaskade der Leukozyten im Entzündungsprozeß	3
2.2. Selektine: Struktur und Funktion	4
2.2.1. L-Selektin.....	6
2.2.2. P-Selektin	7
2.2.3. E-Selektin.....	8
2.2.4. Signaltransduktion durch Selektine	9
2.3. Selektinliganden.....	10
2.3.1. P-Selektin Glykoprotein-1	13
2.3.2. E-Selektin Liganden	14
2.3.3. L-Selektin Liganden	14
2.3.4. Bindungseigenschaften/Multivalenzhypothese	15
2.4. Der Zellrollprozeß.....	17
2.4.1. Flußbedingungen in Blutgefäßen.....	17
2.4.2. Beobachtungen <i>in-vivo</i>	20
2.4.3. Beobachtungen <i>in-vitro</i>	22
2.5. Ziel dieser Arbeit	24
3. Materialien und Methoden.....	26
3.1. Modellmembranen und Chemikalien.....	26
3.1.1. Trägermaterialien und Reinigung.....	26
3.1.2. Membranlipide und Concanavalin A.....	26
3.1.3. Glykolipide.....	27
3.1.4. P-Selektin	27
3.2. Zellkultivation.....	27
3.3. Immuno-Goldmarkierung und Präparation für Elektronenmikroskopie	28
3.4. Kunststoffpartikel.....	28

3.5.	Liposomenpräparationen	29
3.6.	Vesikelfusion	29
3.7.	Self-Assembling	29
3.8.	Langmuir-Blodgett-Technik	30
3.9.	Ellipsometrie	31
3.10.	Rasterkraft Mikroskopie (AFM)	31
3.11.	Zyklovoltammetrie	32
3.12.	Zellrollexperimente	33
3.12.1.	Aufbau der Durchflußapparatur	33
3.12.2.	Durchführung der Rollexperimente	33
3.12.3.	Laser-Scanning-Mikroskopie	34
4.	Ergebnisse und Diskussion	35
4.1.	Entwicklung eines dynamischen Modellsystems	35
4.1.1.	Simulierung der Entzündungsbedingungen	35
4.1.2.	Die Durchflußapparatur	37
4.1.3.	Herstellung der Modellmembranen	39
4.1.3.1.	Self-Assembling-Technik	39
4.1.3.2.	Vesikelfusionstechnik	41
4.1.3.3.	Langmuir-Blodgett-Technik	43
4.1.4.	Das Adhäsionsverhalten von Modellzellen in der Durchflußkammer	47
4.2.	Zellrollexperimente	52
4.2.1.	Einfluß der Ligandenverteilung und -konzentration	56
4.2.2.	Einfluß des Schergrades	66
4.2.3.	Einfluß der Ligandenmolekülstruktur und -flexibilität	68
4.3.	Inhibierung des Zellrollens	71
5.	Zusammenfassung	79
6.	Abbildungsverzeichnis	81
7.	Literaturverzeichnis	84

Abkürzungsverzeichnis

AFM.....	Atomic Force Microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
BSA.....	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CB	Complement Binding (Komplementbindend)
CHO	Chinese Hamster Ovarial Cells (Eizellen der chinesischen Hamsterin)
CHO-E.....	E-Selektin-exprimierende CHO-Zellen
CLSM.....	Confocal Laser-Scanning-Microscope (Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop)
ConA	Concanavalin A
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DMPE.....	1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DPPC.....	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DPPE.....	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin
DSPC.....	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
ESL-1	E-Selektin-Ligand-1
FAK.....	Focal Adhesion Kinase
FITC.....	Fluoresceinisothiocyanat
FRAP.....	Fluorescence Recovery After Photobleaching (Fluoreszenzwiederherstellung nach Ausbleichen)
HEV	High Endothelial Venules (kleinste endotheliale Venolen)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (humane Nabelschnurvenenzellen)
k_{off}	Dissoziationskonstante
k_{on}	Assoziationskonstante
LPS.....	Lipopolysaccharid
MAb.....	Monoclonal Antibody (monoklonaler Antikörper)
MAdCAM.....	Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule (mukosales Adressin Zelladhäsionsmolekül)
MAPK	Mitogen Activated Protein-Kinase
NBD-PC	1-Palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2-yl,3 benzoxadiazol-4-yl)amido]dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholin
NBD-PE	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-(7-nitro-2-yl,3-benzoxadiazol-4-yl)
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBG.....	Phosphate Buffer Gelatine (gelatinehaltiger Phosphatsalzpuffer)
PBS	Phosphate Buffer Saline (Phosphatsalzpuffer)
PEG	Polyethylenglykol
POPC.....	1-Palmitoyl, 2-Oleoyl -sn-glycero-3-phosphocholin
PSGL-1.....	P-Selektin Glykolipid-1
SCR	Short Consensus Repeats
sLe ^a	Sialyl LewisA
sLe ^x	Sialyl LewisX
sLe ^x -Cer.....	Sialyl Lewis ^x -Lipid mit Laktosespacer und Ceramidanker; [(2S,3R,4E)-2-amino-3-hydroxy-2(N-palmitoyl)-octadec-4-en-1-yl]-D (Kalium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galakto-2-nonulopyranosylat)-(2 \rightarrow 3)-(β -D-

- galaktopyranosyl)-(1→4)-[α-L-fucopyranosyl)-(1→3)]-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-(β-D-galaktopyranosyl)-(1→4)-β-D-glucopyranosid
- sLe^x-L0..... Sialyl Lewis^x-Lipid/O Ethoxyeinheiten; (1,2-Di-O-hexadecyl-sn-3-glyceryl)-O-(triethylammonium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galakto-2-nonulopyranosylonat)-(2→3)-(β-D-galaktopyranosyl)-(1→4)-[α-L-fucopyranosyl)-(1→3)]-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosid
- sLe^x-L3..... Sialyl Lewis^x-Lipid/3 Ethoxyeinheiten; [8-(1,2-Di-O-hexadecyl-sn-glycer-3-oxy)-3,6-dioxaoct-1yl]-O-(triethylammonium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galakto-2-nonulopyranosylonat)-(2→3)-(β-D-galaktopyranosyl)-(1→4)-[α-L-fucopyranosyl)-(1→3)]-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosid
- sLe^x-L6..... Sialyl Lewis^x-Lipid/6 Ethoxyeinheiten; [17-(1,2-Di-O-hexadecyl-sn-glycer-3-oxy)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadec-1-yl]-O-(triethylammonium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galakto-2-nonulopyranosylonat)-(2→3)-(β-D-galaktopyranosyl)-(1→4)-[α-L-fucopyranosyl)-(1→3)]-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosid
- sLe^x-L9..... Sialyl Lewis^x-Lipid/9 Ethoxyeinheiten; [26-(1,2-Di-O-hexadecyl-sn-glycer-3-oxy)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacos-1-yl]-O-(triethylammonium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galakto-2-nonulopyranosylonat)-(2→3)-(β-D-galaktopyranosyl)-(1→4)-[α-L-fucopyranosyl)-(1→3)]-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosid
- SPC Sojalecithin
- TNFα..... Tumornekrosefaktor α

1. Einleitung

Zell-Zell- und Zell-Substrat-Wechselwirkungen werden von einer riesigen Gruppe von Molekülen vermittelt, die in der Lage sind, zwischen einer Zelle und einer zellfremden Struktur Bindungskräfte aufzubauen. Diese Moleküle ermöglichen es einer Zelle, an bestimmten Strukturen ihrer Umgebung zu adhären und werden deshalb Adhäsionsmoleküle genannt. Diese Adhäsionsmoleküle bilden die Grundlage für eine große Anzahl biologischer Vorgänge, wie den Zusammenhalt von einzelnen Zellen in Gewebeformationen, die Festigkeit von verschiedenen Geweben untereinander aber auch bei der Erkennung und Eliminierung körperfremder Strukturen, der sogenannten Immunabwehr. Eine besondere Form stellen dabei die zellulären Abwehrmechanismen im Entzündungsprozeß durch die Leukozyten dar. Der Eintritt der Leukozyten in entzündetes Gewebe setzt molekulare Adhäsionsvorgänge voraus, die es den Blutzellen ermöglichen, den Entzündungsherd zu erkennen und am vaskulären Endothel zu binden. Dieser Bindungsprozeß wird durch eine Reihe von Adhäsionsmolekülen kaskadenartig vermittelt und durch die Familie der Selektine eingeleitet. Seit der Kenntnis über die initiale Stellung der Selektine im Entzündungsprozeß in den neunziger Jahren stehen sie im Mittelpunkt zahlreicher Untersuchungen in der pharmazeutischen Forschung und Industrie.

Die ersten Kontakte der Leukozyten mit der Gefäßwand werden durch die Selektine vermittelt, was in Kombination mit dem fließenden Blut und dessen zellulären Bestandteilen als eine rollende Verlangsamung der Leukozyten zu beobachten ist. Dieser Zellrollvorgang stellt eine Sonderform zu anderen Adhäsionsvorgängen dar. Das spiegelt sich in den empfindlich ausbalancierten Bindungseigenschaften der Selektine zu saccharidischen Ligandenstrukturen wider.

Eine pharmazeutisch relevante Modulierung des Zellrollvorganges setzt das Verständnis für die molekularen Mechanismen der Selektinbindungen voraus. Aufgrund der Komplexität der bei der Leukozytenadhäsion stattfindenden Bindungsereignisse bedarf es für funktionelle Untersuchungen des Zellrollvorganges einer Abstraktion der Selektine und ihrer Liganden in einem Modellsystem.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Etablierung einer Modellanordnung, in der das Zellrollen im Scherstrom unter simulierten Entzündungsbedingungen mikroskopisch verfolgt werden kann. In einer entsprechenden Durchflußkammer fungiert eine festkörpergestützte Modellmembran als Endothel, auf der sich selektinexprimierende Zellen rollend im Scherstrom bewegen. In Anlehnung an die natürlichen Selektinliganden werden Glykolipide in die Modellmembran unter Ausbildung verschiedener lateraler Strukturierungen inkorporiert, was die Grundlage dieser molekular-mechanistischen Untersuchungen darstellt.

Darauf aufbauend wird die Modellanordnung für die Suche nach potentiellen Selektininhibitoren genutzt. Die Modulierung des Zellrollprozesses im Entzündungsgeschehen mit derartigen Substanzen könnte einen neuartigen Ansatz in der antiinflammatorischen Therapie darstellen.

2. Theoretischer Teil

2.1. Adhäsionskaskade der Leukozyten im Entzündungsprozeß

Eine Entzündung ist eine lokale Veränderung der Mikrozirkulation des Blutes. Sie ist durch den Transport von Flüssigkeit und Leukozyten in extrazelluläres Gewebe charakterisiert. Die Migration phagozytosefähiger Leukozyten aus dem Blut in benachbartes Gewebe ist für die zelluläre Immunabwehr essentiell und findet hauptsächlich in den kleinsten venösen Gefäßen, den postkapillaren Venolen statt. Ausgelöst durch pathologische Prozesse, wie zum Beispiel Gewebeschädigungen oder Befall durch Mikroorganismen, hat die rezeptorvermittelte Extravasation von Leukozyten in betroffenes Gewebe eine zentrale Bedeutung im Entzündungsprozeß. Um mit der Gefäßwand eine feste Bindung eingehen zu können, müssen die Leukozyten aus dem Blutstrom heraus abgebremst werden, was durch einen Komplex stufenweiser molekularer Wechselwirkungen realisiert wird [1, 2]. Dieser Prozeß wird als Adhäsionskaskade bezeichnet und durch Zell-Adhäsionsmoleküle und verschiedene Aktivierungsfaktoren vermittelt [Abbildung 1].

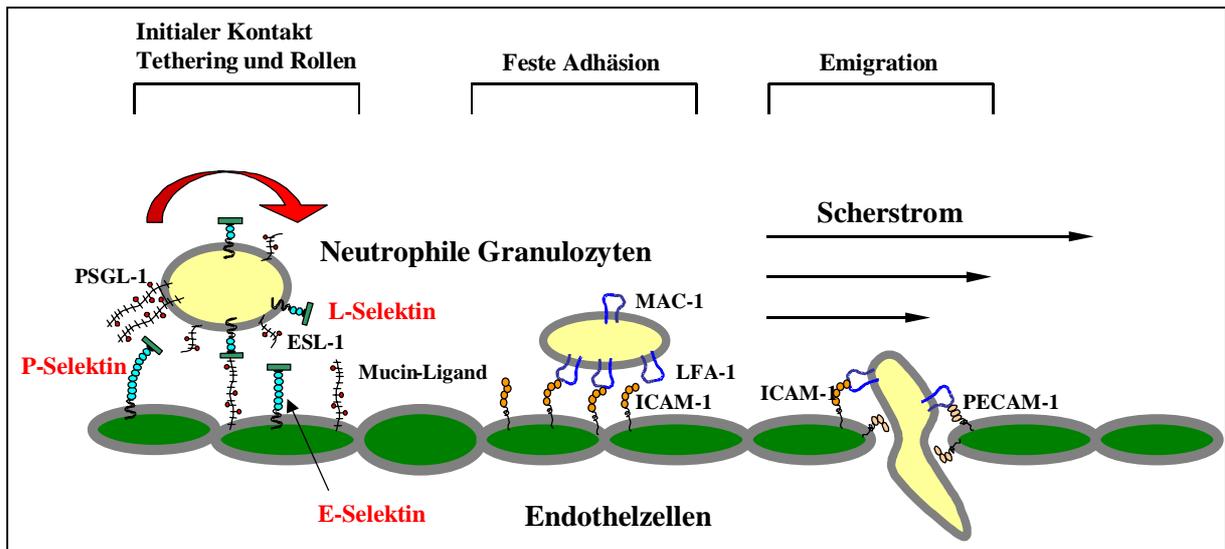


Abbildung 1 Adhäsionskaskade der Leukozyten im Blutgefäß nach einer entzündlichen Stimulierung.

Diese Kaskade wird mit der Freisetzung von Histamin und Thrombin im Gewebe eingeleitet, was eine Gefäßdilataion und damit eine Verlangsamung des Blutstromes bewirkt

[3]. Zusätzlich wird durch die Mediatoren Tumornekrosefaktor (TNF α) und Interleukin (IL-1) die Expression von bestimmten Adhäsionsmolekülen ausgelöst, die über schwach affine Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen einen ersten Kontakt zwischen Gefäßendothel und den fließenden Leukozyten verursachen. Diese initialen Bindungsereignisse sind als sogenanntes Tethering (kurzzeitiges und ruckartiges Abbremsen der Leukozyten) und später als ein Rollen der Leukozyten entlang der Gefäßwand zu beobachten [4]. Dieses Zellrollen wurde bereits 1839 mittels Intravitalmikroskopie beobachtet und von Wagner in Leipzig beschrieben [5]. Zunächst glaubte man, die beobachtete Migration von Leukozyten stehe mit der Nährstoffversorgung der Gewebe in Verbindung [6]. Die Funktion des Leukozytenrollens bei Entzündungen wurde erst 1889 von Cohnheim entdeckt [7]. Die bei diesen Prozessen beteiligten Adhäsionsmoleküle gehören zur Familie der Selektine, sie ermöglichen den ersten, kurzzeitigen Kontakt zwischen Leukozyt und Endothelzelle.

Als Folge dieser rollenden Verlangsamung und räumlichen Konzentrierung von Leukozyten werden nun endotheliale Mediatoren wie zum Beispiel der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) freigesetzt bzw. aktiviert, welche zur Expression von weiteren Adhäsionsmolekülen auf den Leukozyten, den Integrinen, führen. Integrine sind Membranproteine und binden an Proteine der Immunglobulin-Superfamilie, die sich am Endothel befinden. Es kommt zu einer festen Bindung der Abwehrzelle an der Gefäßwandung. Erst dadurch sind die Voraussetzungen für eine Extravasation durch interzelluläre Zwischenräume geschaffen.

2.2. Selektine: Struktur und Funktion

Die Selektine gehören der großen, in der Natur ubiquitär vorkommenden Substanzklasse der Lektine an. Lektine sind kohlenhydratbindende Membranproteine, die weder Antikörper noch Enzym sind [8]. Im Gegensatz zu anderen Protein-Protein-Wechselwirkungen binden Selektine kalziumabhängig an Kohlenhydratstrukturen, die an einem Proteingerüst oder Lipidträger fixiert sind. Das Vorkommen der Selektine beschränkt sich auf das Leukozyten-vaskuläre System. Sie bilden eine Familie von drei langgestreckten, membrangebundenen Glykoproteinen und werden nach den Zellen ihres Vorkommens benannt: L-Selektin findet man auf Leukozyten, E-Selektin auf Endothelzellen und P-Selektin hauptsächlich auf Plättchen aber auch auf dem Endothel. Alle drei Selektine haben homologe Strukturen, die in fünf Domänen und eine membrannahe Spaltungsregion eingeteilt werden.

Im extrazellulären Teil aller Selektine findet man drei Typen von Proteindomänen, die bereits von verschiedenen anderen Proteinen bekannt sind:

- Die äußere, N-terminale Domäne ist die Lektindomäne, sie besteht aus 120 Aminosäuren und ist der Lektindomäne von kalziumabhängigen Säugerlektinen ähnlich [9].

- Ihr schließt sich eine 35-40 Aminosäuren lange Domäne an, die erstmals im epidermalen Wachstumsfaktor gefunden wurde (EGF-Domäne). Diese Sequenz enthält die sogenannten „EGF-Repeats“, die in verschiedenen Proteinen vorkommen und von sechs Cysteineinheiten gebildet werden.

- Dem einzigen „EGF-Repeat“ der Selektine folgt eine veränderliche Anzahl von wiederkehrenden Elementen, den sogenannten Short Consensus Repeats (SCR), jedes besteht aus ca. 60 Aminosäuren. Diese Elemente gleichen jenen Einheiten, die in Komplement-regulatorischen Proteinen vorhanden sind und werden daher auch „Komplement-bindende“ CB-Elemente genannt. Deren spezifische Funktion konnte noch nicht geklärt werden. Die Anzahl der CB Elemente bedingt die Größe und Flexibilität der Selektine und ist artspezifisch. So besitzt L-Selektin von Mensch, Maus und Ratte zwei solcher Elemente. E-Selektin von Mensch, Maus und Hund besitzt sechs, von der Ratte und vom Kaninchen fünf, vom Rind und vom Schwein vier CB-Elemente. P-Selektin vom Mensch hat neun, von Maus, Ratte und Schaf acht, und P-Selektin vom Rind sechs dieser Elemente.

Den drei extrazellulären Proteinabschnitten folgt eine transmembranäre Region, dem sich dann ein zytoplasmatisches Segment von 17 Aminosäuren (humanes L-Selektin), 32 Aminosäuren (humanes E-Selektin) bzw. 35 Aminosäuren (humanes P-Selektin) anschließt [10] [Abbildung 2].

Tatsächlich erbrachte die Klonierung des L-Selektin-Gens den Beweis einer N-terminalen Lektin-Domäne mit Homologie zu C-Typ Lektinen der Säugetiere [9].

Auf der Grundlage der antigenen Affinität von L-Selektin zum MAb MEL14 konnte wiederum erstmals dieses Selektin für die Migration von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe verantwortlich gemacht werden [14]. L-Selektin wird im Gegensatz zu E- und P-Selektin konstitutiv exprimiert, was seine besondere Bedeutung bei dem erwähnten Lymphozyten-Homing deutlich macht. Bereits wenige Minuten nach der Präsentation von L-Selektin auf der Zelloberfläche wird es an der membrannahen Spaltungsregion proteolytisch abgetrennt, was einen regulatorischen Hintergrund vermuten läßt [15]. Diese Art der Downregulation des L-Selektins ist wegen ihrer schnellen Kinetik und der Resistenz gegen die meisten Proteaseinhibitoren sehr ungewöhnlich. Die Modulation der L-Selektin-Funktion im Entzündungsprozeß wird, im Gegensatz zu den anderen beiden Selektinen, zusätzlich durch die entsprechende Ligandenexpression kontrolliert.

Nach erfolgter Bindung von Neutrophilen an einen Entzündungsherd kommt es sofort zur Downregulation des L-Selektins und zur Upregulation einer weiteren Gruppe von Adhäsionsmolekülen: den Integrinen [16, 17]. Leukozytenintegrine $\alpha_M\beta_2$ oder Mac-1 verursachen eine feste Bindung der Blutzellen an der Gefäßwand, nachdem L-Selektin eine rollende Bewegung vermittelt hat. Diese chronologischen und kausalen Zusammenhänge konnten in mehreren in-vivo Versuchen bewiesen werden: MAb DREG 200 gegen L-Selektin inhibiert das Leukozytenrollen [18], während ein anti- β_2 -Integrin Antikörper das Zellrollen nicht beeinflusst, ein festes Anhaften der Leukozyten jedoch unterdrückt [19].

Nach diesen ersten Arbeiten gab es eine Reihe von Veröffentlichungen, die klar demonstrierten, daß alle drei Selektine den initialen Kontakt zwischen Leukozyten und Gefäßendothel in Form einer Zellrollbewegung vermitteln. Bei entzündungsbedingten Selektinbindungen kommt es darüber hinaus zu synergistischen Effekten von L-, P- und E-Selektinen. Außerdem konnte gezeigt werden, daß alpha/beta und gamma/delta T-Lymphozyten neben L-Selektin ebenfalls E- und P-Selektin exprimieren. [20, 21].

2.2.2. P-Selektin

P-Selektin wurde 1984 ursprünglich als ein Membranprotein in den Speichergranula von Blutplättchen entdeckt [22, 23]. Es vermittelt die Bindungen zwischen Neutrophilen und Thrombozyten [24, 25] bzw. Neutrophilen an Endothelzellen [26]. Die Präsentation von P-Selektin an der Zelloberfläche kann über zwei verschiedene Mechanismen ausgelöst werden: P-Selektin ist einerseits in den Granula (α -Granula der Thrombozyten bzw. Weibel-Palade-

Körper der Endothelzellen) gespeichert und wird nach Stimulierung durch Histamin oder Thrombin innerhalb weniger Minuten bzw. Sekunden im Falle der Thrombozyten an die Zelloberfläche transportiert. Eine ähnlich stimulierende Wirkung zeigen auch andere Pharmakophore wie Ca^{2+} -Ionophore oder Phorbol ester [26, 27]. Andererseits kann durch die Zytokine Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder durch Lipopolysaccharid (LPS) der P-selektin codierende mRNA-Level erhöht und somit eine Neusynthese des Proteins initiiert werden.

Exprimiertes P-Selektin wird innerhalb von 30-60 Minuten durch Endozytose wieder von der Zelloberfläche entfernt. Im Gegensatz zu den anderen Selektinen wird P-Selektin teilweise in den Endosomen des Golgi-Apparat zurückgewonnen und in die Weibel-Palade-Körper transportiert [28]. Damit steht dieses P-Selektin sofort wieder zur Verfügung. Der größere Anteil des Proteins gelangt jedoch aus den Endosomen in die Lysosomen, wo es abgebaut wird.

2.2.3. E-Selektin

E-Selektin wurde 1987 erstmals als zytokininduzierbarer Adhäsionsrezeptor von Myeloblasten auf humanen Nabelschnurvenenzellen (HUVEC) beschrieben [29]. Heute ist bekannt, daß dieses Selektin auf Endothelzellen aller postkapillaren Venolen exprimiert werden kann. Unaktiviert präsentieren diese Zellen kein oder nur sehr wenig E-Selektin. Die Stimulierung der endothelialen Zellen durch Zytokine oder LPS führt direkt zu einem Anstieg der E-Selektin-kodierenden mRNA und damit zur Synthese des Glykoproteins. Das neu synthetisierte Selektin gerüst gelangt in das endoplasmatische Retikulum, in dem sich reich Mannose-N-verknüpfte Oligosaccharide befinden. Die Selektine werden posttranslational im Golgi-Apparat glykosyliert und danach in dieser Form an der Zelloberfläche exprimiert [32]. Da E-Selektin nach Aktivierung immer neu synthetisiert wird, werden die höchsten Proteinwerte erst nach 4-8 Stunden erreicht. E-Selektin besitzt zudem eine relativ geringe Halbwertszeit von wenigen Stunden, da es wesentlich schneller als die meisten anderen Membranproteine internalisiert wird, über Endosomen in Lysosomen gelangt und abgebaut wird [30, 31]. Nach 16-24 Stunden verringert sich die Proteinsynthese, und es werden selbst in Gegenwart der genannten Zytokine wieder die niedrigen Ausgangswerte erreicht [32].

2.2.4. Signaltransduktion durch Selektine

Zusätzlich zur eigentlichen Funktion des Leukozytenbindens sind die Selektine in Signaltransduktionen involviert. Zur Zeit geht man davon aus, daß die Signale, die von den Selektin-Selektinligandbindungen erzeugt werden, gemeinsam mit den Signalen weiterer Chemokinstimulationen zu einer Leukozytenaktivierung, -migration und -extravasation führen. Dazu führte die Entdeckung, daß eine Bindung von Sulfatiden an L-Selektin zur Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels und zur Expression von TNF- α - und IL-8-mRNA führt [33]. Zudem wurde beobachtet, daß ein Anbinden von verschiedenen Antikörpern an L-Selektin eine verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivierung einiger Proteine wie zum Beispiel der MAP-Kinase auslöst [34]. Falls bei dieser Signalkaskade die Tyrosinkinase p56^{lck} nicht zur Verfügung steht, kann das L-Selektin ein Zellrollen nicht mehr vermitteln. Deshalb wird eine wesentliche Beteiligung der zytoplasmatischen Selektindomäne im Zellrollprozeß angenommen [35].

Weitere Studien über Bindungen zwischen L-Selektin und dessen Antikörper zeigten als Folgesignal eine erhöhte Expression von Integrinen an der Zelloberfläche [36]. Dagegen kommt es bei einer Bindung von LPS am L-Selektin zu einer verstärkten Produktion von Peroxiden, was wiederum mit L-Selektin-Antikörpern unterdrückt werden kann [37, 38].

Die Untersuchungen der Signalfunktionen von E- und P-Selektin sind weit weniger fortgeschritten. Lediglich die Beeinflussung des Zytoskeletts der Zellen durch die Bindungen von Selektin-Antikörpern konnte beobachtet werden. So kommt es bei derartigen Wechselwirkungen zu Verformungen der Endothelzellen [39]. Dieser Effekt ist wiederum auf eine Beeinflussung des Zytoskeletts zurückzuführen, da bei einem Crosslinking von E-Selektin mit Antikörpern eine Copräzipitation von Zytoskelettproteinen wie Vinculin, Filamin und FAK mit E-Selektin während einer Immunopräzipitation stattfindet. Diese Mitfällung ist bei einfach bindenden Antikörpern nicht zu beobachten [40].

Eine ähnliche Formveränderung der Zellen wurde für aktivierte Blutplättchen beschrieben, verbunden mit einer starken selektiven Phosphorylierung von Threonin, Serin und Tyrosin der zytoplasmatischen Domäne des P-Selektins [41, 42].

Wesentlich intensiver wurden Signaltransduktionswege untersucht, die indirekt durch eine Selektinbindung initiiert werden. In einer Reihe von Arbeiten wurde gezeigt, über welche Signalmechanismen P-Selektin die Aktivierung von β_2 -Integrinen auslöst bzw. beeinflusst: Mit Hilfe des P-Selektins gelangen Leukozyten in direkte räumliche Nähe zur aktivierten Gefäßwand. Auf den Zelloberflächen des Endothelgewebes befindet sich der membrangebundene Plättchen-aktivierende Faktor PAF, dessen Bindung zu seinen Rezeptoren

an den Leukozyten nun extrem erleichtert wird. Das aus Sicht der Leukozyten immobilisierte Chemoattraktant PAF kann somit die Integrinaktivierung stimulieren [43, 44].

Derartige Untersuchungen, insbesondere von indirekten Signalmechanismen der Selektine, beschreiben meist die Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und aktiviertem Endothelgewebe *in-vivo* oder *in-vitro* (konfluente Zellmonolayer). Unter solch komplexen Bedingungen kann die Mitwirkung anderer Stimuli wie zum Beispiel endotheliale Zytokine nicht ausgeschlossen werden. Einen gewissen Vorteil brachte dann der Einsatz von immobilisiertem, rekombinantem E-Selektin.

Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, bezieht sich die physiologische Funktion der Selektine immer auf Bedingungen eines Scherstromes des Blutes bzw. einer dynamischen Zellrollbewegung. Die funktionierenden Selektine stehen immer unter einer mechanischen Beanspruchung, deshalb sollten noch weitere umfangreiche Signaltransduktionen zu erwarten sein, insbesondere vor dem Hintergrund, daß die Selektine über ihren zytoplasmatischen Teil direkt mit dem Zytoskelett verbunden sind. Die Aufklärung dieser Phänomene steht noch weitestgehend aus, da sich die genannten Untersuchungen meist auf statische Bindungen zwischen Selektin und Antikörper bzw. zwischen Antikörper und selektinexprimierenden Zellen beziehen oder aber statische Zell-Zell-Wechselwirkungen beschreiben.

2.3. Selektinliganden

Die Selektinliganden umfassen eine heterogene Gruppe von transmembranären Glykoproteinen und Glykolipiden, die den Selektinen bestimmte Kohlenhydratstrukturen präsentieren.

Fast alle Zelladhäsionsmoleküle im lebenden Organismus binden auf der Basis von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Deshalb erscheint es ungewöhnlich, daß die Selektine an Strukturen binden, die aus einem Proteingrundgerüst oder einem Lipidträgermolekül bestehen, welche mit bestimmten Kohlenhydratverbindungen modifiziert sind. Das Proteingerüst ist dabei alleine nicht in der Lage, für die Selektine als erkennbare Liganden zu fungieren. Es stellt lediglich eine Grundstruktur dar, die erst durch enzymatische Glykosylierung ihre Lektinaffinität verliehen bekommt. Aus diesem Grund werden Lektinerkennungssysteme auch als eine funktionale Triade aus Rezeptor, Ligand (oder Bindungsepitop) und Trägermolekül beschrieben, wobei das Bindungsepitop und das Trägermolekül zum klassischen Begriff „Ligand“ zusammengefaßt werden.

Prinzipiell sind Selektinliganden rutenartige, saure Glykoproteine. Sie sind langgestreckt und tragen an ihren NH₂- bzw. OH-gruppenreichen Seitenketten über Asparagin N-verknüpfte bzw. über Threonin und Serin O-verknüpfte Oligosaccharide. Die O-glykosidreichen

Ligandstrukturen werden Mucine genannt. Diese Glykokonjugate stellen die eigentlichen Bindungsepitope dar und werden vom Protein in ihrer Gesamtheit als ein hochaffiner Selektinligand präsentiert [Abbildung 3]. Eine Strukturaufklärung der Mucine konnte trotz bekannter Aminosäuresequenz nicht erfolgen, da eine exakte Lokalisation der Saccharide am Proteingrundgerüst noch nicht gelungen ist.

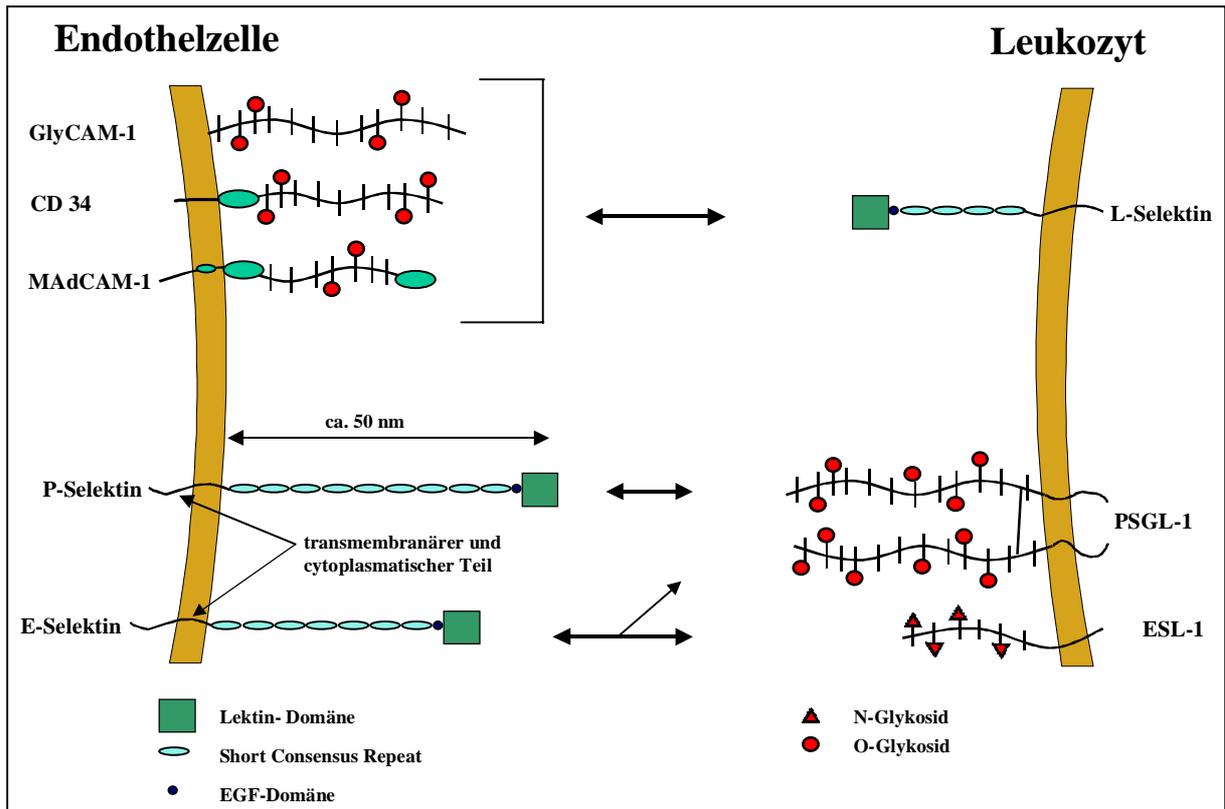


Abbildung 3 Schematische Darstellung von Struktur und Lokalisation der Selektine und ihrer entsprechenden Liganden.

Obwohl die Struktur dieser Oligosaccharideinheiten nicht für einzelne Arten spezifisch ist, geht man bei den übergeordneten Seitenkettenstrukturen aber auch bei endständigen Modifikationen der Oligosaccharide von einer zelltypischen Art- und Gewebespezifität aus. Zusätzlich werden die Ligandenstrukturen durch die Abstammung der Zellen und den Entwicklungszustand eines Individuums reguliert. Membranständige Oligosaccharide besitzen neben ihrer Sonderstellung bei Zelladhäsionsvorgängen eine große Bedeutung bei den Wechselwirkungen einer Zelle mit ihrer Umgebung. Insbesondere der schnelle Wechsel von verschiedenen Oberflächensacchariden während der gesamten Embryogenese von Säugern ist bemerkenswert [45]. Solche Untersuchungen deuten an, welche bedeutende Rolle die oberflächlichen Oligosaccharide im komplizierten Zusammenspiel aller regulatorischen

Mechanismen im menschlichen Organismus während dieser Phase umfassender Strukturveränderungen spielen.

Oligosaccharidkonstrukte besitzen ein riesiges Potential zur Kodierung von Informationen, da sie zusätzlich zur Sequenzkodierung durch die anomere Konfiguration der Monomeren α - oder β -verknüpft sein können. Hinzu kommt die Möglichkeit von Verzweigungen oder Substitutionen durch Sulfat-, Phosphat- oder Acetylgruppen. Zieht man nun noch die unterschiedlichen Anordnungen der Glykokonjugate an wiederum verschiedenen Trägerproteinen hinzu, ergibt sich eine immense Zahl von Variationsmöglichkeiten, die es von Rezeptormolekülen zu dekodieren gilt.

Von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist bekannt, daß sie nur unter einer sehr hohen Spezifität und Selektivität zustande kommen. Bei den Selektinliganden läßt sich dagegen eine solche ausgeprägte Spezifität zu ihren Rezeptoren nicht erkennen. So können selektinbindende Oligosaccharide ihre Bindungsaffinität auf verschiedene Trägermoleküle übertragen [46]. Selbst saccharidmodifiziertes BSA ist in der Lage, an Selektine zu binden [47, 48].

Ein weiterer Punkt, in dem sich Kohlenhydrat- von Proteinwechselwirkungen unterscheiden, ist in der schwachen Bindungsstärke von Lektinen und Selektinen zu einzelnen Glykokonjugaten zu finden. Es gibt nur eine geringe Anzahl von Glykoproteinen, die wiederum mit einer begrenzten Anzahl von Oligosacchariden modifiziert sind, die zu den hochaffinen Bindungspartnern der Selektine gezählt werden können. Nur sie werden als die eigentlichen physiologischen Selektinliganden betrachtet.

Essentielle Kohlenhydrat-Grundstrukturen an den bisher gefundenen Selektinliganden sind die Sialinsäure^(b) und die Fukose. O-verknüpfte fukosylierte Sialinsäurederivate mit dem Protein werden auch Sialomucine genannt. Die Kohlenhydrat-Bindungsepitope am PSGL-1 wie auch an den anderen physiologischen Selektinliganden sind hauptsächlich das O-verknüpfte Tetrasaccharid Sialyl Lewis^x (sLe^x) oder Sialyl Lewis^a (sLe^a). Diese Leitstrukturen der Selektinliganden bestehen aus N-Acetyllaktosamin, welches mit einer Fukose α 1-3 (für sLe^x) oder α 1-4 (für sLe^a) verknüpft ist. Endständig befindet sich eine N-Acetyl-Neuraminsäure (Sialinsäure) [Abbildung 4].

^b Als Sialinsäuren werden alle N-Acyl-Neuraminsäuren bezeichnet

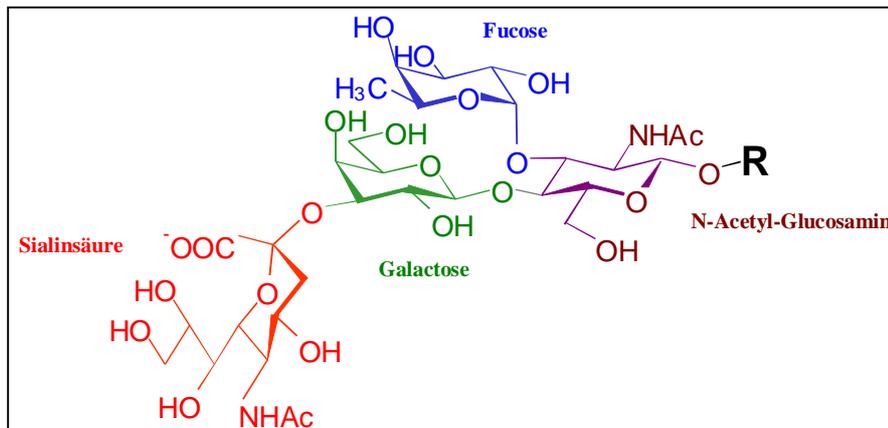


Abbildung 4 Struktur des Sialyl Lewis^x: Neu5Acα2-3Galβ1-4[Fucα1-3]GlcNAc.

Die Bedeutung der Fukose wird bei Patienten deutlich, die unter einem Fukosestoffwechseldefekt leiden: Beim Fehlen der Fukosyltransferase können die Granulozyten kein fukosehaltiges sLe^x exprimieren, dadurch können die Zellen an Entzündungsherden nicht aus dem Blutstrom heraus abgebremst werden, was ständige bakterielle Infektionen zu Folge hat [49].

2.3.1. P-Selektin Glykoprotein-1

Der P-Selektin Ligand PSGL-1 (P-Selektin-Glykoprotein-1) ist ein über Disulfidbrücken verknüpftes dimeres 250-kDa Protein und wurde 1992 bei einer Affinitätschromatographie mit gereinigtem P-Selektin entdeckt und ein Jahr später durch Expressionsklonierung von HL60 Zellen auf COS Zellen transfiziert [50, 51]. PSGL-1 wird von einer Reihe von Zellen mit myeloblastischer, lymphoider oder dendritischer Abstammung exprimiert. Es wird als wichtigster, wenn nicht gar einziger Ligand für P-Selektin auf menschlichen Neutrophilen und stimulierten T-Zellen präsentiert [52]. Darüber hinaus wird eine nicht unerhebliche Affinität zu E-Selektin [53, 54, 55, 66, 56] und L-Selektin (teilweise kontrovers) [57, 58] diskutiert.

PSGL-1 ist der derzeit am besten untersuchte Selektinligand. So verhindert der monoklonale Antikörper MAb-PL-1 ein Zellrollen menschlicher Neutrophiler auf isoliertem P-Selektin [59]. Durch die Blockade der PSGL-1 Bindungen mit MAb PL-1 wird das Zellrollen von menschlichen Neutrophilen auf Mesenterialzellen der Ratte unterdrückt [60]. MAb gegen PSGL-1 der Maus ist sogar umfassend in der Lage, die Migration von Neutrophilen in entzündetes Mäuseperitoneum zu verhindern [61]. Dieser Antikörper

unterdrückt *in-vitro* auch dann das Zellrollen, wenn noch andere sLe^x-tragende Glykoproteine vorhanden sind [62].

Bei der Glykosylierung des PSGL-1 spielt die Fukosyltransferase eine entscheidende Rolle, da eine Co-Transfektion des Enzyms in COS-Zellen eine Bindung an P-Selektin ermöglicht. Für eine hochaffine Selektinbindung benötigt das Protein keine N-verknüpften Seitenketten [67], muß aber zusätzlich zur exakten Anordnung der Oligosaccharide am N-Terminus sulfatiert sein [63, 64, 65]. All diese Untersuchungen unterstreichen, daß PSGL-1 den bedeutendsten Liganden für P- aber auch für die anderen Selektine darstellt, um ein Zellrollen zu ermöglichen. Es wird daher auch als Leitstruktur für die Erforschung der physiologischen Relevanz aller Selektinliganden betrachtet [66, 67, 68].

2.3.2. E-Selektin Liganden

E-Selektin bindet früheren Studien zufolge sowohl an Oligosaccharide, Glykolipide und Glykoproteine [69, 70, 71]. Allerdings hat sich in der letzten Zeit herausgestellt, daß alle hochaffinen Bindungen zum E-Selektin durch Proteasebehandlung der ligandentragenden Myeloid-Zellen aufgehoben werden können. Das läßt den Schluß zu, daß ausschließlich Glykoproteine zu starken Wechselwirkungen mit E-Selektin in Frage kommen.

E-Selektin bindet wie oben erwähnt ebenfalls an PSGL-1, jedoch mit wesentlich geringerer Affinität. 1995 konnte mit Hilfe von E-Selektin-IgG in einer Affinitätschromatografie der hochaffine E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1) aus Myeloidzellextrakt identifiziert werden [72]. Dabei handelt es sich um N-verknüpfte Glykoproteine. ESL-1 findet man auf einer Vielzahl von Zellen, die Expression ist jedoch wie beim PSGL-1 auch von der myeloblasten-spezifischen Fukosyltransferase abhängig. Eine Kreuzreaktivität von ESL-1 zu den anderen Selektinen ist noch weitgehend ungeklärt.

E-Selektin zeigt eine gewisse Affinität zu L-Selektin, allerdings nur, wenn das L-Selektin von Neutrophilen exprimiert und glykosyliert wird. Dagegen zeigt das L-Selektin von Lymphozyten keine Bindungsaffinität [73]. Außerdem kann neutrophiles L-Selektin nicht über eine E-Selektin-Affinitätschromatographie isoliert werden [72]. Aus diesen Gründen wird das L-Selektin nicht als funktionaler Ligand für das E-Selektin betrachtet.

2.3.3. L-Selektin Liganden

Über die Bindungen der L-Selektinliganden an Selektinen bzw. deren Funktionalität ist derzeit relativ wenig bekannt. In den HEV wurden 1992 das lösliche Molekül GlyCAM-1 (Glycosylation-Dependent Cell Adhesion Molecule-1) und ein Jahr darauf das

membranständige CD34 als potentielle L-Selektinliganden erkannt. Ähnlich dem PSGL-1 handelt es sich dabei um O-verknüpfte Sialomucine mit einem hohen Sulfatierungsgrad [74, 75]. Eine direkte Bindung von Neutrophilen oder Lymphozyten an CD34 oder GlyCAM-1 ist jedoch nicht klar bewiesen.

Das Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule-1 (MAdCAM-1) ist in der Lage, L-selektinabhängiges Zellrollen und -binden zu vermitteln. Es wird in den intestinalen Peyer-Platten^(c) exprimiert und besteht aus einer mucinartigen und einer Immunglobulin-domäne [76, 77, 78].

Als weiterer möglicher Ligand für L-Selektin wird das endotheliale Tetrasaccharid Heparansulfat vermutet [79].

Keiner der bis jetzt gefundenen L-Selektinliganden ist bei der extralymphatischen Leukozytenadhäsion am entzündeten Gewebe direkt beteiligt. Allerdings sind Neutrophile fähig, L-selektinabhängig über immobilisierte Leukozyten zu rollen [80]. Das legt die Expression eines L-Selektinliganden auf Neutrophilen nahe.

2.3.4. Bindungseigenschaften/Multivalenzhypothese

Selektinvermittelte Bindungsereignisse von Leukozyten an Gefäßwandungen sind, bedingt durch den Scherstrom des Blutes und die Größe der weißen Blutzellen, starken mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt. Deshalb scheint es verwunderlich, daß gerade Kohlenhydratwechselwirkungen für diese Aufgabe verantwortlich sind. Im Vergleich zu Protein-Protein-Wechselwirkungen besitzen einzelne Oligosaccharide eine auffallend geringe Affinität von ca. 1mM zu ihren Rezeptoren, so auch sLe^x zu den Selektinen [81]. Auch durch einfache Summierung der Bindungskräfte vieler Saccharidstrukturen erreicht man nicht die ca. 10⁵-fach höhere Affinität zu den Selektinen, wie sie physiologische Sialomucine aufweisen können. Auf der Suche nach stärker selektinbindenden Substanzen erbrachten strukturelle Modifikationen der Oligosaccharide ebenfalls keine vergleichbaren Bindungsaffinitäten. Trotzdem besteht in Forschung und Industrie ein großes Interesse an Verbindungen, die in Anlehnung an das lösliche sLe^x Selektinbindungen verdrängen, und somit Entzündungserscheinungen kontrollieren können. Einige dieser inhibitorischen Substanzen, die von einer japanischen Arbeitsgruppe synthetisiert wurden, sind in Kapitel 4.3 beschrieben. Erst kürzlich wurde von Novartis Pharma AG ein 30-fach Selektin-affineres sLe^x-Mimetikum vorgestellt [82].

^c Die Peyer-Platten sind eine Ansammlung von 15-20 Lymphknötchen am unteren Dünndarm. Sie wurden im 17. Jh von dem Arzt Johann Konrad Peyer entdeckt.

Dennoch spielt die Beteiligung einer großen Anzahl von Bindungsepitopen eine entscheidende Rolle. Auf der einen Seite ist bekannt, daß L-Selektin [83] und die Liganden ESL-1 und PSGL-1 [84, 85] auf den Zelloberflächen nicht homogen verteilt sind, sondern auf Microvilli^d räumlich konzentriert präsentiert werden. Zum anderen ist eine Vielzahl von Glykokonjugaten an einem hochaffinen Selektinligandmolekül essentiell (vgl. Struktur des Sialomucins; Kapitel 2.3). So ist z.B. das mucinspezifische Enzym O-Sialoglykoprotease in der Lage, alle Mucine von der Zelloberfläche zu entfernen, wohingegen die Oberflächenexpression von sLe^x nicht beeinflusst wird [86]. Das übrige, auf den Zelloberflächen homogen verteilte sLe^x, ist nicht in der Lage, *in-vivo* ein Zellrollen zu vermitteln.

Um eine ausreichend hohe Affinität zu den Selektinen vorweisen zu können, müssen die physiologischen Selektinliganden in ihrer Funktion als Rollrezeptor-Liganden folgende Bedingungen erfüllen:

- a) exakte Zusammensetzung und Sequenz der Oligosaccharidstruktur,
- b) räumliche Konzentrierung der Oligosaccharide durch die Anordnung auf den Sialomucinen,
- c) exakte sterische Anordnung und Präsentation der Oligosaccharide durch das Mucingrundgerüst,
- d) räumliche Konzentrierung der Sialomucine in Clusterarealen der Zelloberfläche, wie z.B. den Microvilli,

Nur durch die Summe all dieser Voraussetzungen sollte es den Selektinliganden möglich sein, eine entsprechend hohe Bindungskraft dem Scherstrom des Blutes entgegensetzen zu können und ein Leukozytenrollen zu vermitteln. Weil es sich bei diesem Prozeß um das Miteinander einer Vielzahl einzelner Bindungsereignisse handelt, spricht man auch von der Multivalenzhypothese.

Ausgehend von dieser Hypothese stellt sich die Frage nach Bedeutung und Funktion von sLe^x Glykolipiden. Es ist nicht bekannt, ob das Zellrollen an mucinartige Proteinstrukturen gebunden ist oder ob Glykolipide unter bestimmten Voraussetzungen ebenfalls ein Rollen vermitteln können. Der Multivalenzhypothese zufolge müßte eine räumliche Konzentrierung der Bindungsepitope die dafür notwendigen Bindungskräfte aufbringen können. Dagegen spricht allerdings die wesentlich geringere Flexibilität und Erkennbarkeit der Glykolipid-Kopfgruppen durch den geringen Abstand zur Zellmembran.

^d Microvilli sind 0,5 bis 1,5 µm über die Zelloberfläche hinausragende Zytoplasmafortsätze, die ein Lumen begrenzen.

Auch die Bedeutung des gelösten sLe^x von 10⁻³ mM im Zytosol ist bisher ungeklärt. Eine Beteiligung der Tetrasaccharide an der Modulation des Zellrollprozesses wäre nur unter den besonderen kinetischen Bindungseigenschaften und einer lokalen Konzentration des sLe^x vorstellbar.

2.4. Der Zellrollprozeß

Der Zellrollprozeß stellt eine Sonderform der Zelladhäsion dar und wird seit nunmehr über 150 Jahren phänomenologisch untersucht. Das Rollen ist eine abbremsende Bewegung von Leukozyten aus dem Blut, während sie, getrieben vom Scherstrom, an der Gefäßwand entlangrollen. Ein selektinvermitteltes Zellrollen steht immer am Anfang der Adhäsionskaskade einer Leukozytenmigration aus dem Blut (Rollen→Adhäsion→Transmigration) (Kapitel 2.1). Wird innerhalb dieser Kaskade ein einziger Schritt unterdrückt, wird der gesamte Migrationsprozeß von Leukozyten in entzündetes Gewebe verhindert. Auch die Blockade von Selektinwechselwirkungen hat ein Ausbleiben einer entzündlichen Immunantwort oder des Lymphozyten-Homing zur Folge [1, 87, 88]. Aus dieser großen Bedeutung wird ersichtlich, weshalb die Selektine, ihre Liganden und der Rollvorgang an sich, in den letzten Jahren Gegenstand intensivster Forschungen geworden sind.

2.4.1. Flußbedingungen in Blutgefäßen

Die Leukozytenmigration und somit das Zellrollen findet ausschließlich in den kleinsten venösen Gefäßen, nicht aber in arteriellen Gefäßen statt, was auf einen Einfluß sowohl der Strömungscharakteristik als auch den strukturellen Eigenschaften der Endotheloberfläche schließen läßt. Die Venolen könnten idealerweise als zylindrische Rohre betrachtet werden, durch die im laminaren Strom eine Newtonsche Flüssigkeit fließt. Eine solche Flüssigkeit ist nicht komprimierbar und die Viskosität gleich und konstant. Die Verhältnisse in einer solchen idealen Röhre lassen sich durch die Poiseuillesche Gleichung beschreiben. Aus ihr geht hervor, daß die Durchflußmenge proportional zur Kraftdifferenz zwischen Anfang und Ende des Rohres, proportional zur vierten Potenz des Durchmessers und indirekt proportional zur Rohrlänge und Viskosität der Flüssigkeit ist^(e):

$$I = \pi r^4 \frac{\Delta p}{8\eta l}$$

^e Δp : Druckdifferenz zwischen Rohranfang und -ende, r : Rohrradius, η : dynamische Viskosität der Flüssigkeit und l : Rohrlänge

Daß die Strömungsstärke mit der 4. Potenz des Radius wächst bedeutet, daß sich bei einer Vergrößerung des Gefäßdurchmessers um nur 20% (z.B. bei einer Vasodilatation) die Durchflußmenge verdoppelt. Verringert sich dagegen der Gefäßdurchmesser um 30% (z.B. durch Cholesterinablagerungen), steigt bei gleichem Blutstrom der Druck auf das Vierfache.

Diese Gleichung auf Blut angewendet, würde aber auch einen ungeheuren Reibungswiderstand in den Kapillaren voraussagen. Daß dieser Widerstand tatsächlich nicht vorhanden ist liegt daran, daß die Viskosität des Blutes weder einheitlich noch konstant ist. Verantwortlich dafür sind hauptsächlich die Erythrozyten. Sie fließen zusammen mit den anderen zellulären Blutbestandteilen konzentriert im Zentrum des Gefäßes wie durch einen noch dünneren Schlauch und schaffen dabei einen zellfreien äußeren Rand. Durch diesen Effekt ist die effektive Blutviskosität in der Gefäßmitte relativ hoch, wohingegen sie in unmittelbarer Nähe der Wandung stark erniedrigt ist [89]. Daraus ergibt sich ein abgestumpftes Geschwindigkeitsprofil [Abbildung 5].

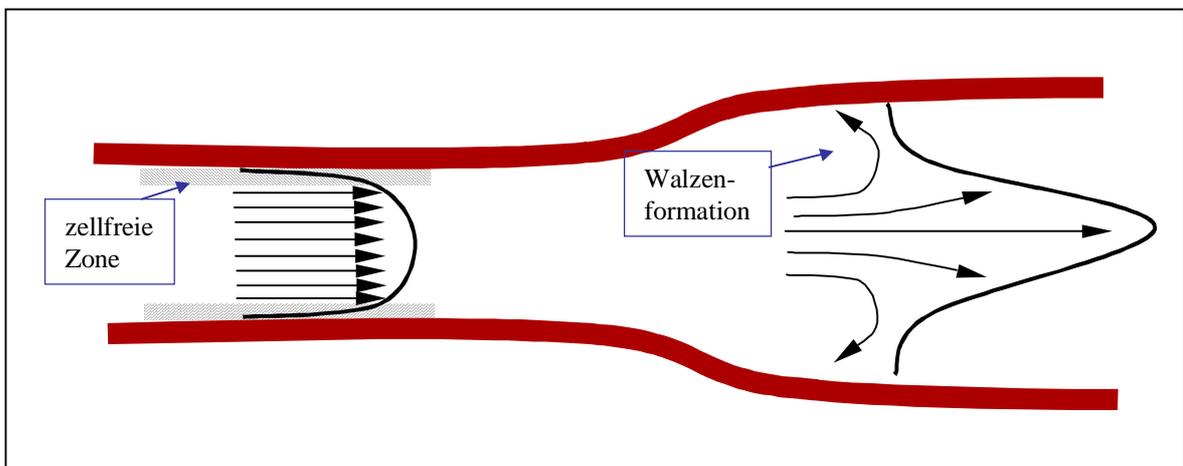


Abbildung 5 Geschwindigkeitsprofil des Blutes in einer Kapillare; schematisch. Übergang vom gesunden zum entzündeten Abschnitt.

Die Flußgeschwindigkeit nimmt bei diesem Profil am zellfreien äußeren Rand ca. 2,1-fach stärker zu als bei einer Newtonschen Flüssigkeit [90].

Unter diesen physiologisch gesunden Bedingungen in den Kapillaren ist ein Zellrollen kaum möglich, da sich:

- a) gerade die schwereren Leukozyten im Zentrum des Gefäßes bewegen und sich der Zellwand nicht nähern können und

b) die durch das steile Geschwindigkeitsprofil bedingten Kräfte auf eine Zelle in Gefäßwandnähe viel zu groß sind, um irgendeine Bindung zustande kommen zu lassen [91].

Unter bestimmten Voraussetzungen wird es den Leukozyten allerdings doch ermöglicht, mit der Gefäßwand in Kontakt zu kommen. In sehr kleinen Venolen von ca. 10-30 μm werden die Leukozyten durch deformierbare Erythrozyten an die Gefäßbegrenzungen gedrückt [92]. In den größeren Gefäßen mit einem Durchmesser zwischen 30 und 100 μm dagegen neigen die Erythrozyten, bedingt durch die geringere Fließgeschwindigkeit, teilweise zur Aggregation. Diese relativ massereichen Zellaggregate nehmen nun die zentrale Position im Strömungsprofil der Kapillare ein und verdrängen die Leukozyten in Randbereiche [93].

Diese Bedingungen in den Venolen ändern sich dramatisch im Falle einer Entzündung: es kommt zu einer Gefäßaufweitung und dadurch zu einer durchschnittlichen Verringerung der Flußgeschwindigkeit. Außerdem erhöht sich die Gefäßpermeabilität, wodurch verstärkt Plasma aus dem Lumen austritt und sich das Zellpackungsvolumen erhöht (erhöhter Hämatokrit). Zusätzlich steigt die Aggregationstendenz der Erythrozyten durch verstärkte Interleukin-6-Wirkung. All diese Faktoren bewirken eine Art „Walzenformation“ des Geschwindigkeitsprofils der Blutflüssigkeit. Das bedeutet, daß die Fließgeschwindigkeit von der Gefäßwand aus wesentlich schwächer ansteigt und erst in der „Rohrmitte“ hohe Werte annimmt [Abbildung 5]. Auf diese Art und Weise können bedingt durch ihre Größe und ihr Gewicht besonders die Leukozyten unter verminderten mechanischen Belastungen mit dem Endothelgewebe in Kontakt kommen [94].

Bewegen sich Leukozyten in unmittelbarer Nähe einer Gefäßwand, sind sie in jedem Falle einer gewissen Scherrate ausgesetzt. Die Scherrate ist der Gradient der axialen Flußgeschwindigkeit und hat die Dimension einer Geschwindigkeit pro Längeneinheit (auf den Radius bezogen) oder s^{-1} . Der Scherstreß τ_w beschreibt die gleichen Bedingungen und gibt die Scherkraft an, welche pro Flächeneinheit Gefäßwand wirkt. Ihre Dimension ist eine Kraft pro Fläche (z.B. dyn/cm^2).

Für die Berechnung des Gradienten der Flußgeschwindigkeit in axialer Richtung wird der Schergrad herangezogen. Er stellt eine Geschwindigkeit pro Längeneinheit dar und wird in s^{-1} angegeben. Der Schergrad ergibt sich aus

$$\frac{dv}{dr} \gamma_w = 2,1(8v_b / D)$$

wobei v_b die mittlere Blutflußgeschwindigkeit und D der Durchmesser der Gefäße ist. Zur Berechnung des Schergrades in Durchflußkammern wird auch die Gleichung

$$G = 6 Q / b h^2$$

benutzt, wobei Q die Durchflußrate (Volumen Flüssigkeit pro Zeiteinheit), b die Breite und h die Höhe der Flußkammer darstellt. Der Schergrad in postkapillaren Venolen liegt in Abhängigkeit der verschiedenen Gewebe und Organe zwischen 150 und 500 s^{-1} .

Das durch diese Beziehungen beschriebene Phänomen hat zur Folge, daß die Kräfte, die auf eine Zelle nahe des Gefäßrandes wirken, sehr inhomogen sind. Direkt an der Wandung ist die Fließgeschwindigkeit des Blutplasmas sehr gering, dadurch liegen auch nur geringfügige Kräfte in diesem Bereich an. Dagegen ist die Zelle, die sich mehr in der Gefäßmitte befindet, wesentlich größeren flußbedingten Schubkräften ausgesetzt. Durch dieses Kräfteungleichgewicht wird eine Zelle im Randbereich eines fließenden Systems ein gewisses Drehmoment erfahren, was in einer rotierenden Zellbewegung resultiert; auch ohne jeglichen Kontakt mit der Gefäßwandung. Diese Zellrotation kann bei bis zu 40% der Leukozyten bei einer Intravitalmikroskopie beobachtet werden, wird jedoch nicht als Zellrollen betrachtet. Sie ist weder rezeptorvermittelt noch ist die Vorwärtsbewegung durch Zell-Zell-Wechselwirkungen beeinflusst und soll deshalb auch nicht Gegenstand dieser Arbeit sein.

2.4.2. Beobachtungen *in-vivo*

Der Zellrollprozeß kann *in-vivo* mit Hilfe der sogenannten Intravitalmikroskopie beobachtet werden. Bei dieser Methode wird relativ gut durchsichtiges Gewebe direkt mit einem Mikroskop betrachtet. Dafür eignen sich besonders die Gewebe des Mesenteriums [95], bestimmte Bereiche in der Backentasche [96] oder die Milz [97]. Weiterhin wird die Intravitalmikroskopie an Cornea-Gefäßen, Mäuseohren und dem Cremaster-Muskel durchgeführt. Allerdings setzen solche Untersuchungen eine Sektion voraus. Mit einem dauerhaft implantierten Beobachtungsfenster in der Haut lassen sich auch Beobachtungen über einen längeren Zeitraum durchführen [98, 99].

Es gibt jedoch auch bestimmte Gewebe, die ohne eine Verletzung die Intravitalmikroskopie zulassen. Dazu zählen die Haut von Fledermausflügeln [100] und die rasierte Ohrmuschel von Mäusen [101]. Aber auch am menschlichen Ohr oder oberhalb des Halbmondes des Fingernagelbettes lassen sich unter dem Mikroskop Venolen finden, die über eine ausreichende Entfernung parallel zur Oberfläche verlaufen, um mittels einer Intravitalmikroskopie Leukozytenrollen beobachten zu können.

Das Zellrollen beginnt mit einem initialen Kontakt des Leukozyten mit dem Endothel, dem sogenannten Tethering. Sobald sich eine erste molekulare Bindung ausgebildet hat, kommt es bedingt durch den Scherstrom zu einer Abflachung der Zelle und folglich zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche mit einem Durchmesser von ca. 4 μm [102, 103]. Die Fähigkeit der Leukozyten zur Verformung unter Scherstromeinfluß stellt eine wesentliche Grundvoraussetzung für das Zellrollen dar und zwingt die Rollgeschwindigkeit in bestimmte physiologische Grenzen. Je stärker die Scherkraft des Blutes auf eine rollende Zelle wirkt, desto stärker flacht sie ab, um so größer bildet sich die Kontaktfläche zum Endothel aus und um so kleiner wird die Angriffsfläche, die die Zelle der Flüssigkeit entgegenstellt. Andererseits ist ein gewisses Maß von Zellabflachung für eine rollende Bewegung essentiell. Unterschreitet der Schergrad des Blutes einen bestimmten Wert, flachen die Leukozyten so wenig ab, daß die Kontaktfläche für ein Rollen zu klein ist. Dieses sogenannte „threshold phenomenon“ verhindert ein zufälliges Auslösen der Adhäsionskaskade, insbesondere in größeren venösen Gefäßen mit geringer Fließgeschwindigkeit.

Die Zellrollgeschwindigkeit liegt unter physiologischen Bedingungen und bei unterschiedlichem Schergrad zwischen 15 und 40 $\mu\text{m/s}$ [104]. Unter besonderen Bedingungen wie zum Beispiel bei einer Entzündung oder bei übermäßiger Vasokonstriktion bzw. -dilatation oder starken Abweichungen des Schergrades kann die Rollgeschwindigkeit zwischen 5 und 100 $\mu\text{m/s}$ schwanken [105, 106, 107, 108]. In diesen Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, daß im Falle eines Entzündungsprozesses alle drei Selektine am Leukozytenrollen bzw. der Zellextravasation beteiligt sind, während das Lymphozyten-Homing ausschließlich durch L-Selektin vermittelt wird [109, 110].

Untersuchungen an Selektin-defizienten Mäusen geben einen weiteren vergleichenden Einblick in die Bedeutung der Selektine. Bei L-Selektin-defizienten Mäusen wird sowohl die Emigration als auch das Rollen der Neutrophilen stark unterdrückt [111]. Während bei den P-Selektin-Mutanten diese beiden Kriterien nur in einer frühen Phase zu beobachten sind, kommt es beim Fehlen von E-Selektin zu keinerlei Auswirkungen. Das legt die Vermutung nahe, daß die Bedeutung des E-Selektins zu einem späteren Zeitpunkt des Zellrollvorganges, in der Überleitung zur festen Adhäsion liegt [112, 113, 114]. Ein synergistischer Effekt von E- und P-Selektin wird bei doppelt mutierten Mäusen ersichtlich. All diese Daten wurden 1997 von Bullard und Beaudet in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Mutation	Gesundheitszustand	Leukozytenzahl	Neutrophil-Emigration 0-4 Stunden	Neutrophil-Emigration 24 Stunden	Leukozytenrollen
P-Selektin	normal	erhöht	reduziert	normal	stark erniedrigt
E-Selektin	normal	normal	normal	normal	normal
L-Selektin	normal	normal	reduziert	reduziert	stark erniedrigt
P- und E-Selektin	spontane Infektionen	sehr stark erhöht	keine	normal	sehr stark erniedrigt

Tabelle 1 Veränderung von Entzündungsparametern Selektin-defizienter Mäuse nach Bullard [115].

2.4.3. Beobachtungen *in-vitro*

Aufgrund der Vielfalt der beeinflussenden Faktoren auf die Zelladhäsionskaskade im Entzündungsprozeß läßt sich die Bedeutung und Funktion einzelner Selektine anhand von *in-vivo* Untersuchungen nur sehr oberflächlich beschreiben. Seit ca. 10 Jahren wird deshalb versucht, den Zellrollprozeß als solchen aus dem lebenden Organismus zu abstrahieren. In diesen *in-vitro* Versuchen ist man bestrebt, alle Adhäsionsereignisse möglichst ausschließlich auf die Selektine und ihre Liganden zu beschränken. Dadurch sollte es möglich sein, die molekularen Mechanismen des Rollvorganges aufzuklären und Fragestellungen nach dem Zellrollen als Sonderform einer Zelladhäsion oder dem empfindlichen Gleichgewicht zwischen Festhalten und Loslassen der Bindungspartner zu beantworten.

Lawrence und Springer konnten 1991 erstmals ein Rollen von Neutrophilen auf isoliertem und immobilisiertem P- und später auch E-Selektin aufzeigen. Im Gegensatz dazu kam es auf immobilisierten Integrinen stets zur festen Adhäsion, nicht jedoch zum Zellrollen [116, 117]. Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß die L-Selektin vermittelte Rollgeschwindigkeit von 50-100 $\mu\text{m s}^{-1}$ um das zehnfache höher ist als bei P- und E-Selektin [118]. Durch ein extremes Ausdünnen des immobilisierten Selektins und der Variation der angelegten Scherkraft konnte rechnerisch auf die Bindungscharakteristika einzelner Selektinbindungskomplexe geschlossen werden: die relevanten Assoziations- und Dissoziationskonstanten ($k_{\text{on}}=1,5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} 0,95 \text{ s}^{-1}$) lassen, verglichen mit anderen

makromolekularen Interaktionen, auf eine sehr schnelle Bindungskinetik schließen [119]. Allerdings kann die Fähigkeit der Zellrollvermittlung nicht nur auf diese Interaktionskonstanten beschränkt werden. So besitzen bestimmte zellmembrangebundene Antikörper bei Wechselwirkungen mit Dinitrophenol ähnlich dimensionierte Konstanten, sie können jedoch kein Zellrollen induzieren sondern nur eine feste Adhäsion [119]. Es wird vermutet, daß die vorwiegend hydrophoben Bindungskräfte der Antikörper eine zu geringe elastische Dehnbarkeit besitzen, um einen dynamischen Rollprozeß zu unterstützen.

Mittels AFM wurde unter Vermessung eines einzelnen Selektinmoleküls an der Mikroskopspitze gefunden, daß sich die Dissoziationskonstante nicht linear mit der Scherbelastung ändert. Das deutet darauf hin, daß ein Bindungsbruch nicht entweder durch die Bindungsstärke oder die Dissoziationskonstante beschrieben werden kann, vielmehr sind beide Parameter über den Zeitfaktor miteinander verknüpft, der die Schnelligkeit der Bindungslösung angibt. Je schneller an einer Selektinbindung gezogen wird, um so weniger erhöht sich die Bindungskraft. Wird also eine rollende Zelle einem extrem hohen Scherstrom ausgesetzt, sind die Kräfte, die dem Bindungsbruch entgegenwirken relativ klein, sodaß eine übermäßige Beanspruchung der Verankerung der Moleküle in der Zellmembran und am Zytoskelett ausbleibt. Die Lebenszeit eines Rezeptor-Ligand-Komplexes ist demnach bei kleinen Kräften länger und bei großen Kräften kürzer [120].

Die Anforderungen an die Bindungseigenschaften der Selektine bestehen also nicht nur in schnellen on- off- Raten, sondern auch in einer überdurchschnittlichen Dehnbarkeit der Bindungen, ohne dabei einen Bindungspartner aus seiner Verankerung und Verknüpfung mit dem Zytoskelett herauszureißen. Zusätzlich besitzen bei Selektininteraktionen die Flexibilität und Länge sowohl der Selektinmoleküle als auch der entsprechenden Ligandenstrukturen eine außerordentliche Bedeutung. Die Short Consensus Repeats der Selektine sind nicht direkt an der Bindung zum Saccharidmolekül beteiligt. Eine Veränderung der Anzahl der SCR sollte also nur einen Einfluß auf die mechanischen Eigenschaften wie Dehnbarkeit und Beweglichkeit des Adhäsionsproteins haben. Patel et al. untersuchten die Bindungseigenschaften von verkürztem P-Selektin [121]. In einem statischen Assay zeigten im Vergleich zum Wildtyp (Selektin mit 9 SCRs) die Mutanten mit nur 2 oder mehr SCRs keine Unterschiede im Adhäsionsverhalten. Im dynamischen Rollassay dagegen können die kurzen P-Selektine mit weniger als 4 SCRs kein Rollen mehr vermitteln. Im Fall von genau 4 SCR-Einheiten sind nur wenige Zellen in der Lage, in eine Rollbewegung überzugehen, zeigen sich dabei aber extrem intolerant gegenüber Scherkraftveränderungen.

Obwohl viele dieser Studien mit immobilisierten Adhäsionsmolekülen auf einer artifiziellen Oberfläche durchgeführt wurden, kann man daraus auf die physiologische

Bedeutung der Selektine im Zellrollprozeß schließen. Neben den physikalischen Parametern der Leukozyten und Gefäße sind die intrinsischen molekularen Eigenschaften der Selektinbindungskomplexe eine weitere Grundlage für das Zellrollen.

2.5. Ziel dieser Arbeit

Die Selektine nehmen durch die Besonderheiten ihrer Adhäsionseigenschaften eine Schlüsselrolle im Entzündungsprozeß ein. Eine Blockierung bzw. Modifizierung der Selektinbindungen stellt einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuartiger antiinflammatorischer Arzneimittel dar.

Ziel dieser Arbeit waren deshalb Untersuchungen der Bindungsmechanismen der Selektine im Zellrollprozeß. Die Selektine und deren Liganden sollten dabei in einem abstrakten System untersucht werden, um Wechselwirkungen anderer Adhäsionsmoleküle und störende Parameter ausschließen zu können. Gleichzeitig wird eine selektive Beeinflussung einzelner Parameter möglich. Da die Beweglichkeit und Anordnung der Selektinliganden von entscheidender Bedeutung zu sein scheint, wurden statt der natürlichen Mucine synthetische Glykolipide verwendet, die sich in einer künstlichen festkörpergestützten Modellbiomembran befinden. Über diese Modellmembran wurden E-Selektin-transfizierte CHO-Zellen (CHO-E) in einem laminaren Fluß gespült und alle Wechselwirkungen der Zellen mit der Biomembran mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie verfolgt. Mit dieser Anordnung sollten Fragestellungen zur Multivalenzhypothese, zu Minimalanforderungen an Selektinliganden und zur Inhibierung oder Modifizierung der Selektinbindungen unter Entzündungsbedingungen beantwortet werden.

Der erste Teil dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines Modellsystems. Bei der Konstruktion der Durchflußapparatur (Kapitel 3.12.1) standen die Gewährleistung eines laminaren Flüssigkeitsstromes, die Voraussetzungen für eine auswechselbaren transparenten Träger für die Modellmembran und die Installation der Apparatur am Mikroskop im Vordergrund.

Für die Erzeugung, Übertragung und Charakterisierung von Modellmembranen (Kapitel 3.8) gab es in unserer Arbeitsgruppe beste Voraussetzungen. Unbekannt war jedoch das Verhalten der synthetischen Glykolipide in der Lipidmatrix in Hinblick auf Stabilität und laterale Beweglichkeit und Anordnung der einzelnen Modellmembranlipide. Die Funktion der Kammer sollte zunächst mit isolierten, natürlichen Glykolipidgemischen getestet werden, um dann mittels der reinen synthetischen Liganden ein Zellrollen zu erzeugen.

Die abschließende Aufgabe stellte die Suche nach potentiellen Selektininhibitoren und deren Testung dar.

Für die Bereitstellung der Glykolipide, der Inhibitorsubstanzen und die Charakterisierung der Modellmembranen waren zahlreiche Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen notwendig.

3. Materialien und Methoden

3.1. Modellmembranen und Chemikalien

3.1.1. Trägermaterialien und Reinigung

Als transparente Trägermaterialien für die Modellmembranen dienten Deckplättchen (Glas, rund, 18 mm Durchmesser) für alle mikroskopischen Untersuchungen. Für Charakterisierungen der Modellmembranen mittels Ellipsometer und AFM kamen Träger aus Silizium zum Einsatz. Diese Materialien wurden vor dem Gebrauch einer Reinigung unterzogen, um eine sehr homogene und chemisch eindeutige Oberfläche zu erhalten. Nach mechanischem Polieren wurden die Glaträger dafür mit einer Mischung aus konz. $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (7/3) für 30 min bei 80°C im Ultraschallbad behandelt (oxydative Entfernung aller Oberflächenverunreinigungen). Siliziumwafer wurden im ersten Schritt mit $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1/1/5) unter den gleichen Bedingungen behandelt. Danach wurde 30 min mit MilliQ[®] (hochreines Wasser mit einer Leitfähigkeit von $18,2 \mu\text{S}$) gespült. Um alle Oberflächenmoleküle zum Silanol zu reduzieren, folgte ein Reinigungsschritt mit $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1/1/5) für 30 min bei 80°C im Ultraschallbad. Schließlich wurden die Träger 30 min mit ultrareinem Wasser gespült und getrocknet.

3.1.2. Membranlipide und Concanavalin A

1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC), 1-Palmitoyl, 2-Oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (POPC), 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DMPC) wurden bei Sigma (Deisenhofen, Deutschland) gekauft. Die Reinheit der Lipide wurde mittels HPLC und HPTLC analysiert und war immer größer als 99%. POPC wurde während dieser Arbeiten häufig untersucht, es zeigten sich jedoch keine oxydativen Zersetzungsprodukte. Die Fluoreszenzmarker 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD-PE) und 1-Palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amido]dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholin (NBD-PC) wurden bei Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) gekauft. α -Methylmannosid, Glutaranhydrid, ConA und FITC ConA wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

3.1.3. Glykolipide

Neutrale Glykosphingolipide wurden von der Arbeitsgruppe Müthing an der Universität Bielefeld mittels High-Performance Thin-Layer Chromatographie gereinigt. Die Detektion der Ganglioside erfolgte durch nichtdestruktive Visualisierung mit Hilfe von anionischen lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen. Diese wurden anschließend in einer Sepharose Anionenaustauscher Chromatographie wieder abgetrennt [122, 123].

Das lösliche Sialyl Lewis X (sLe^x) wurde von Synthesome (Moskau, Rußland) bezogen.

Lipidverankerte sLe^x-Derivate wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um R.R. Schmidt von Ch.Gege und G. Hummel an der Universität Konstanz synthetisiert und ihre Reinheit mittels HPTLC und NMR bestimmt [124, 125]. Neben dem löslichen sLe^x wurden Glykolipide hergestellt, bei denen das Oligosaccharid entweder durch unterschiedlich lange Ethoxyeinheiten oder durch Galaktose oder ohne Spacer direkt mit dem Lipidanker verknüpft ist.

3.1.4. P-Selektin

P-Selektin wurde in unserer Arbeitsgruppe aus Thrombozyten isoliert, gereinigt und konzentriert. Humane Thrombozyten wurden zunächst durch schrittweise Zentrifugation (200xg und 1500g) von Erythrozyten weitgehend getrennt. Das Thrombozytenkonzentrat wurde durch einen Frier-Tau-Prozeß lysiert, anschließend wurden die Membranbestandteile bei 2000xg abzentrifugiert und mit 1%iger Triton-X100 behandelt. Dadurch gehen Membranproteine in Lösung und nicht gelöste zytoskelettverankerte Membranbestandteile können bei 2000xg abgetrennt werden.

Die so gewonnenen P-Selektinreichen Membranproteine wurden affinitätschromatografisch über eine ConcanavalinA-Säule gereinigt. Die P-Selektin-ConA Bindungen wurden mittels Methylmannosid verdrängt, damit konnte das Selektin mit Octylglykosid als Lösungsvermittler von der Chromatographiesäule eluiert werden.

3.2. Zellkultivation

E-Selektin-transfizierte Chinese Hamster Ovarial Zellen (CHO-E Zellen) waren ein Geschenk von P. Vasalli. Die Zellen wurden in MEM- α Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 100 nM Penicillin/Streptomycin kultiviert. 5×10^4 CHO-E Zellen wurden in Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C in 5% CO₂ drei bis vier Tage inkubiert, bis sie nahezu konfluent ausgewachsen waren. Nach einer dreiminütigen Trypsinisierung mit 2 ml 0,25% Trypsin in EDTA wurden die Zellen in

Zentrifugationsröhrchen überführt, für 3 min bei 430xg zentrifugiert und gewaschen. Danach erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der Zellen mit Calcium GreenTM -2 AM (Molecular Probes, Inc. Europe BV Leiden, Holland). Die so behandelten Zellen bleiben bei ständigem Schütteln für ca. vier Stunden in Suspension, in dieser Zeit wurden die Zellrollexperimente durchgeführt (Kapitel 3.12.2).

3.3. Immuno-Goldmarkierung und Präparation für Elektronenmikroskopie

Ca. $1,8 \times 10^7$ Zellen wurden in PBS gewaschen, mit 2,5% Formaldehyd in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, mit PBS gespült, anschließend mit 50 mM Glycin in PBS (blockiert freie Aldehydgruppen) und schließlich mit 0,5% BSA und 0,2% Gelatine in PBS (PBG) gewaschen. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C mit spezifischem anti-E-Selektin IgG der Ratte unter Schütteln inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBG wurden die Zellen für eine Stunde mit 12 nm goldmarkiertem sekundärem Antikörper inkubiert (anti-rat IgG der Ziege; Dianova) und danach sorgfältig mit PBG und PBS gewaschen (alle Zentrifugationen wurden bei 1200 rpm = 120xg durchgeführt).

Für die Einbettung wurden die Zellen zwei Stunden mit 4% Formaldehyd/5% Glutaraldehyd in PBS nachfixiert, danach mit PBS gewaschen und in 1,25% Agar suspendiert. Kleine Zell-Agar Stücke wurden konventionell in Aceton getrocknet, in Durcupan (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland) eingebettet und bei 65°C und 100°C ausgehärtet. Ultradünne Schnitte wurden mit UO₂-Acetat und Pb-Citrat bedampft.

3.4. Kunststoffpartikel

Die Kunststoffpartikel als künstliche Modellzellen bestanden aus Melamin und hatten einen Durchmesser von 250 nm, 850 nm, 2,6 µm bzw. 7 µm (AERES GmbH Berlin). Die Partikel wurden zur Funktionalisierung mit einer Lipiddoppelschicht überzogen. Dazu wurden sie in einem ersten Arbeitsgang in trockenem Chloroform über ca. 16 Stunden unter Rühren mit Cyanurchlorid und N,N-Diisopropylethylamin bei Raumtemperatur aktiviert. Das überschüssige Cyanurchlorid wurde entfernt, und nach 3 min Zentrifugation bei 120xg wurden die Partikel wieder in Chloroform aufgenommen und mit DPPE umgesetzt. Durch die selektive Kopplung der DPPE-Aminogruppe am Cyanurchlorid weisen die Alkylreste nach außen und verleihen den Partikeln eine Hydrophobizität.

Im zweiten Arbeitsgang wurde auf diesen Monolayer durch Vesikelfusion ein Bilayer komplettiert. Dafür wurden ein Teil der Partikel mit einem ca. 10-50fachen Überschuß (berechnet nach Lipidmenge) an ca. 100 nm großen Liposomen versetzt und ca. 16 Stunden

geschüttelt. In dieser Zeit fusionierte ein Teil der Liposomen zu einem dichten Bilayer auf den Partikeln. Der Liposomenüberschuß wurde durch Zentrifugation (3 min 120xg) von den Partikeln entfernt.

3.5. Liposomenpräparationen

Zur Herstellung der verschiedenen einfachen oder ligandhaltigen Liposomenpopulationen wurden die entsprechenden Lipide oder Lipidmischungen in frisch destilliertem Chloroform/Methanol (2:1/v:v) gelöst (Endkonzentration ca. 30 µmol/ml), in einen Rundkolben gefüllt und zur Bildung eines Lipidfilms am Vakuumrotationsverdampfer bei ca. 35°C getrocknet. Im Falle einer Fluoreszenzmarkierung wurden zur Chloroform-Stammlösung 2 mol% die lipophilen Fluoreszenzmarker NBD-PE oder Rhodamin-PE (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) gegeben. Danach erfolgte die Zugabe von PBS (1% Ca²⁺) und die Dispergierung der Lipide mit Hilfe von Glasperlen durch manuelles Schütteln über 10 Minuten. In Abhängigkeit der jeweiligen Phasenübergangstemperatur wurde das Schütteln bei Raumtemperatur für SPC und bei ca. 45°C für DPPC und DSPC durchgeführt. Die Dispersionen wurden anschließend über mind. 16h mechanisch geschüttelt (100 Bewegungen/min) und danach fünfmal durch eine Polycarbonatmembran (Nucleopor, Porengröße 200nm) extrudiert (Extruder, Lipex Biomembrane, Vancouver, Canada).

3.6. Vesikelfusion

Die Vesikelfusionstechnik ermöglicht das Aufbringen einer Lipid-Bischicht auf einen Feststoffträger. Dazu wurden die gereinigten oder auch hydrophobisierten Trägermaterialien (siehe Kapitel 3.1.1) mit einer Liposomensuspension inkubiert. Dabei kommt es zum spontanen Aufspreiten der Vesikel auf der festen Oberfläche.

Nach Entfernen der nicht gespreiteten Vesikel wurden ellipsometrische, fluoreszenzmikroskopische und zykovoltammetrische Untersuchungen der Struktur der Lipidlayer durchgeführt.

3.7. Self-Assembling

Frisch gereinigte Trägermaterialien (siehe Kapitel 3.1.1) wurden mit Monochlor-dimethyl-octadecyl-Silan (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) bei 50°C für 30 Minuten inkubiert. Bei dieser Prozedur bildet sich, bedingt durch die sehr hohe Hydroxylgruppendichte

an der Feststoffoberfläche, ein äußerst homogener Monolayer, der dem Material hydrophobe Oberflächeneigenschaften verleiht [Abbildung 6].

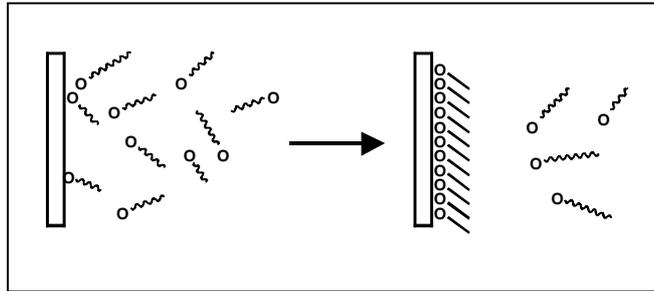


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Bildung einer organisierten Monoschicht an einer hydrophilen Oberfläche durch molekulare Adsorption aus organischer Lösung.

Die so vorbehandelten Träger wurden wie im folgenden Kapitel 3.8 beschrieben nach der Langmuir-Blodgett-Technik weiterbehandelt.

Auf gleiche Weise wurde bei der Beschichtung der Glasoberflächen mit Monochlor-dimethyl-aminopropylsilan (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verfahren.

Eine weitere Self-Assembling-Methode zur Modifizierung frisch gereinigter Trägermaterialien bestand in der Kopplung der Glasoberfläche mit Cyanurchlorid. Die zweite Bindungswalenz des Cyanurchlorids stand einer weiteren kovalenten Bindung zur Verfügung und wurde für die Bildung einer monomolekularen Proteinschicht (zum Beispiel P-Selektin) benutzt.

3.8. Langmuir-Blodgett-Technik

Die in frisch destilliertem Chloroform/Methanol (2:1/v:v) gelösten Lipide oder Lipidgemische (Prozentangaben erfolgen immer in mol%) wurden auf der Wasser/Luft Grenzflächen eines Langmuir-Troges (Filmwaage Typ R&K Riegler & Kirstein GmbH, Deutschland) aufgespreitet. Als Subphase wurde MilliQ[®] Wasser verwendet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels (15 min bei Raumtemperatur) wurde der Lipidfilm bei 25°C mit einer Geschwindigkeit von 0.01 nm² min⁻¹ Molekül⁻¹ bis 38 mN/m komprimiert. Bei diesem Lateraldruck wurde der Lipidfilm auf die wie in Kapitel 3.7 hydrophobisierten Materialien nach einem x-Typ Transfer übertragen. Die Tauchgeschwindigkeit betrug dabei 0,5 mm/s, und das Übertragungsverhältnis lag zwischen 0,95 und 1.

Diese feststofffixierten Modellmembranen wurden innerhalb der nächsten zwei Stunden für weitere Experimente verwendet.

3.9. Ellipsometrie

Die Ellipsometrie ist eine leistungsfähige optische Meßmethode zur Bestimmung sehr dünner Schichten. Dabei wird die Änderung des Polarisationszustandes einer einfallenden Lichtwelle infolge der Reflexion oder Transmission an einer massiven Probe bestimmt. Aus ihr lassen sich Rückschlüsse auf die optischen und die daraus abgeleiteten Eigenschaften wie zum Beispiel die Schichtdicke der Probe ziehen. Die besondere Stärke dieser Meßmethode liegt dabei in der hohen Empfindlichkeit und Meßgenauigkeit auch bei sehr geringen Schichtdicken (zum Beispiel Phospholipidmonolayer), sowie in der zerstörungsfreien Untersuchung der Proben.

Für die ellipsometrischen Messungen dieser Arbeit stand ein Tischellipsometer SE 400 (SENTECH GmbH, Berlin) mit kontinuierlich in X-Y-Richtung veränderbarer Probenhalterung für die Mapping Ellipsometrie zur Verfügung. Für die Messungen wurden die Lipidschichten auf Siliziumscheiben 8x8 mm aufgetragen.

3.10. Rasterkraft Mikroskopie (AFM)

Das Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope = AFM) stellt eine Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskops dar. Das AFM erlaubt Untersuchungen in molekularen und atomaren Dimensionen, ohne besondere Anforderungen an die elektrische Leitfähigkeit der zu untersuchenden Probe zu stellen [126]. Diese Methode bietet die Möglichkeit, die Oberflächen biologischer, auch mechanisch empfindlicher Systeme in ihrer natürlichen Umgebung ohne spezielle Präparation mit hoher Auflösung darzustellen [127,128].

Beim AFM wird eine Abtastspitze, die sich am Ende einer federnden Zunge (Cantilever) befindet, rasterförmig über die Probenoberfläche geführt. Die Spitze hat im Abtastbereich einen Durchmesser von nur ca. 50 nm. Ein Detektor mißt die Auslenkung des Cantilevers in der z-Achse, entsprechend der Topografie der Probenoberfläche. Die dreidimensionale Abbildung der Oberfläche wird nun durch die Darstellung der gemessenen z-Auslenkung des Cantilevers als Funktion der x-y-Position der Rasterbewegung der Probe erzeugt.

Die Rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Dr. U. Bakowsky (Max-Planck-Institut für Mikrostrukturphysik, Halle) am Nanoscope IIIa (digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) durchgeführt. Die hydratisierten Proben befanden sich unter MilliQ[®], PBS oder MEM α .

3.11. Zyklovoltammetrie

Die Zyklovoltammetrie ist eine kapazitive Strommessung, bei der das System Elektrode-Lipidschicht-Elektrolyt als idealer Plattenkondensator angesehen wird. Mit ihr ist es möglich, die effektive Schichtdicke der Modellmembran zu ermitteln. Zusätzlich kann durch die Verwendung verschieden großer Moleküle als wandernde Ladungsträger die Durchlässigkeit der Membran zum Beispiel durch Risse und Löcher charakterisiert werden.

In der üblichen zykvoltammetrischen Dreielektroden-Versuchsanordnung wird eine beschichtete stationäre Arbeitselektrode (Glas-Kohlenstoff- oder Goldelektrode) in einen ruhenden Elektrolyten eingetaucht. Dieser Elektrode wird ausgehend von einem Anfangspotential ein sich zeitlich änderndes Elektrodenpotential aufgeprägt, das nach Erreichen eines Umkehrpotentials wiederum zeitlich linear zum Ausgangswert zurückgeführt wird.

Da keine absoluten Einzelelektrodenpotentiale gemessen werden können, ist das Elektrodenpotential der Arbeitselektrode immer auf eine nicht polarisierte Referenzelektrode bezogen, zum Beispiel Ag/AgCl oder die gesättigte Kalomelektrode. Um einer Zerstörung der Referenzelektrode, einer induzierten Polarisierung oder Reaktion an der Arbeitselektrode und einer durch den inneren Widerstand des Elektrolyten bedingten Strom hervorgerufenen Differenz zwischen Sollpotential und Meßzellpotential vorzubeugen, wird eine zusätzliche Hilfs- oder Gegenelektrode verwendet. Bei dieser Anordnung wird nahezu der gesamte Strom über die Gegenelektrode abgeleitet, während die Referenzelektrode aufgrund ihrer hohen Impedanz stromlos bleibt. Mit Hilfe eines kommerziellen Potentiostaten läßt sich nun das gewünschte Sollpotential zwischen Arbeits- und Referenzelektrode einstellen. Durch Operationsverstärker wird an der Arbeitselektrode ein Strom erzwungen.

Die verwendete Apparatur für die zykvoltammetrischen Experimente besaß neben dem Potentiostaten (Potentioscan Wenking POS 88, Bank Elektronik, Deutschland) mit der selbstgebauten Meßzelle einen Funktionsgenerator, mit dem das gewünschte Potentialprogramm gesteuert wurde. Die analog anfallenden Daten wurden im Computer gewandelt und mit dem Programm SIGNALYS (Kontron, Deutschland) aufgezeichnet.

3.12. Zellrollexperimente

3.12.1. Aufbau der Durchflußapparatur

Die Durchflußapparatur wurde aus einem massiven Block von farblosem, durchsichtigen Polyacryl gefräst. Die äußeren Maße sind so gewählt, daß die Apparatur im beweglichen x-y-Tisch eines inversen Mikroskopes befestigt werden kann. Im unteren Teil des Kunststoffes wurde die eigentliche Durchflußkammer mit den Abmessungen 11 x 6 x 0,45 mm herausgearbeitet, die Ecken wurden dabei abgerundet, um Strömungswirbel zu verhindern. Die Kammer wird von unten mit einem runden Objektträger-Glasplättchen (Durchmesser 18 mm) mit Hilfe eines anschraubbaren Metallringes abgedeckt. Als Reservoir für das Fließmedium diente ein 250 ml Scheidetrichter, der an einem skalierten Stativständer in variabler Höhe befestigt wurde. Bevor das Fließmedium in die Durchflußkammer gelangt, muß es eine Blasenfalle passieren (ein 2 ml fassendes Glasgefäß, in dem sich ein Luftpolster befindet). Diese Blasenfalle ist mit einem Septum abgedichtet, durch das die Zellsuspension injiziert werden kann. Alle Schlauchverbindungen hatten einen Innendurchmesser von 1 mm.

3.12.2. Durchführung der Rollexperimente

Vor Beginn der Experimente wurde die Durchflußkammer am Mikroskop installiert. Der Mikroskoptisch wurde auf 37°C temperiert. Mit Hilfe des im Mikroskoptisch integrierten Luftgebläses wurde die Durchflußapparatur für mindestens 20 Minuten ebenfalls auf 37°C temperiert. Der Flüssigkeitsspiegel im Reservoir wurde auf die entsprechende Höhe gebracht, um eine bestimmte Durchflußmenge pro Zeit zu erreichen. Die Korrelation zwischen Höhendifferenz und Durchflußmenge wurde durch die ausgeflossene Menge Medium in einen 10 ml Maßkolben geeicht.

Die wie in Kapitel 3.2 vorbereiteten Zellen sollten sich in einer relativ hochkonzentrierten Suspension befinden, um im Mikroskop-Bildausschnitt möglichst viele Zellen auswerten zu können. Deshalb wurden die Zellen nicht im gesamten Fließmedium suspendiert, sondern 10^6 Zellen in 150 µl Medium direkt durch das Septum der Blasenfalle in den Flüssigkeitsstrom injiziert. Nach ca. 3 Sekunden waren die Zellen im Bildausschnitt angelangt, jetzt wurde der Fluß unterbrochen, um eine Zellsedimentation zu ermöglichen. Nach einer Sedimentationszeit von 5 Minuten befinden sich alle Zellen mit der Modellmembran der Kammer in Kontakt, und der Fluß wurde wieder hergestellt. Ab diesem Zeitpunkt wurde alle zwei Sekunden ein digitales Mikroskopbild abgespeichert. Durch diese Bildsequenz läßt sich die Bewegung jeder einzelnen Zelle nachvollziehen und auswerten.

Bei Versuchen mit den löslichen Inhibitoren der Arbeitsgruppe Ikami (Japan) wurden den Zellsuspensionen 30 ng der entsprechenden Substanzen zugefügt.

3.12.3. Laser-Scanning-Mikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen der Modellmembranen oder der Zellrollexperimente wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt (CLSM 410 invert, Carl Zeiss, Deutschland). Bei einem solchen inversen Mikroskop wird die Probe mit einem Laserstrahl gescannt. Die Wellenlänge des Laserlichtes lag mit 488 nm oder 543 nm im Bereich der Anregungsmaxima der von uns verwendeten Fluoreszenzmarker. Das Emissionslicht gelangt über mehrere Strahlenteiler und Kantenfilter zu einem Photomultiplier und wird dort elektronisch ausgewertet. Das konfokale Prinzip des Mikroskopes beruht auf einer variablen Lochblende vor dem Multiplier, die die Überstrahlungen des Emissionslichtes reduziert, die in z-Richtung der Probe entsteht. Dadurch ist es möglich, nur Fluoreszenzen zu detektieren, die sich in unmittelbarer Nähe des Untersuchungsobjektes befinden. Emissionslicht von darüber befindlichen Zellen bzw. Liposomen wird nicht erfaßt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Entwicklung eines dynamischen Modellsystems

4.1.1. Simulierung der Entzündungsbedingungen

Die Grundlage dieser Arbeit stellt die Abstraktion des Leukozytenrollprozesses unter Entzündungsbedingungen *in-vitro* dar. Um Zell-Zell-Wechselwirkungen auf die Selektine mit ihren Liganden einschränken zu können, müssen beide Bindungspartner aus ihrem nativen Umfeld herausgelöst werden. Diese Notwendigkeit ergibt sich einerseits aus dem synergistischen Zusammenspiel vieler Adhäsionsmoleküle auf den natürlichen Zellen, andererseits sollten die Entzündungsbedingungen in einem *in-vitro* Modell stabil vorhanden sein, ohne eine vorherige Aktivierung durch Entzündungsmediatoren.

Als rollende Zellen wurden CHO-E Zellen und als Kontrolle die nicht transfizierten CHO (Chinese Hamster Ovarial) Zellen verwendet. Diese Zellen entsprechen mit einem Durchmesser von ca. 10 μm den Dimensionen von Granulozyten und Lymphozyten. Sie lassen sich ausgesprochen gut handhaben, da sie im Gegensatz zu Leukozyten nicht unspezifisch mit den meisten Oberflächen interagieren. Die CHO-E Zelllinie wurde mit dem Maus-E-Selektinen transfiziert, was zu einer konstitutiven Proteinexpression auf der Zelloberfläche führt. Eine ähnliche E-Selektinpräsentation wird auf dem Endothelgewebe nach einer entzündlichen Stimulierung beobachtet. In einer elektronenmikroskopischen Aufnahme können die Proteine mit E-Selektin-mAb markierten Goldpartikeln (Immunogold-Labeling) sichtbar gemacht werden (Abbildung 7).

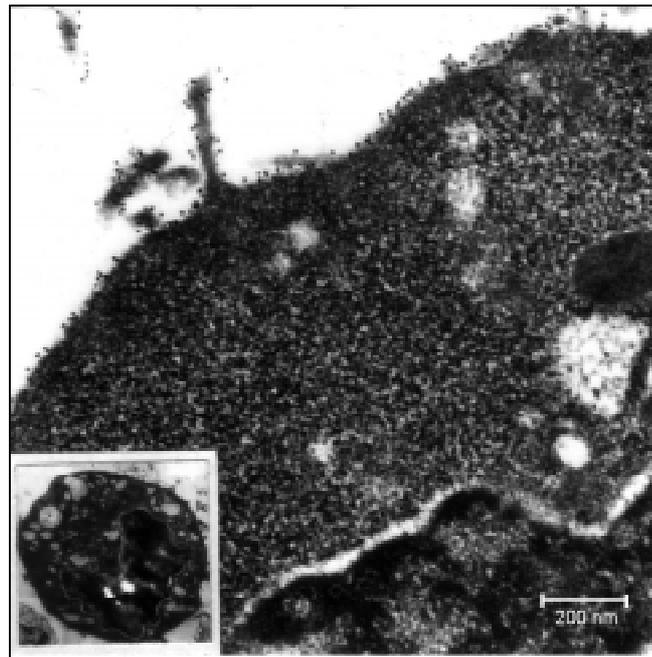


Abbildung 7 Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer CHO-E Zelle (unten links) und der vergrößerte Ausschnitt der Zelloberfläche. Die Zelle wurde mit Immunogold-markierten Antikörpern behandelt, die als dunkle Punkte an der Zellmembran zu erkennen sind.

Aus dem Bild geht hervor, daß die Zellen nahezu rund sind und die Selektinmoleküle homogen auf der Oberfläche verteilt sind. Das Fehlen von Mikrovilli und lokaler Anhäufungen der Adhäsionsmoleküle ist eine Voraussetzung für Untersuchungen im Hinblick auf die Multivalenzhypothese, da Manipulationen der lateralen Molekülverteilung ausschließlich an der korrespondierenden liganddotierten Modellmembran durchgeführt werden können. Eine vorgegebene Strukturierung der Selektine auf den CHO-E Zellen würde dagegen keinen Versuchsaufbau mit homogener Verteilung aller Adhäsionsmoleküle zulassen. Die Zellen lassen sich gut kultivieren, mit Fluoreszenzfarbstoff markieren und in flüssigem Stickstoff lagern. Sie können sofort nach dem Auftauen in Nährmedium für Zellrolluntersuchungen verwendet werden. Das eröffnet die Möglichkeit, eine Vielzahl von Versuchen mit Zellen der gleichen Passage durchzuführen. Auf diese Weise lassen sich statistische Abweichungen minimieren, die ihren Ursprung in der Variabilität von biologischem Material haben.

4.1.2. Die Durchflußapparatur

Das nächste Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung, Konstruktion und Testung eines *in-vitro* Versuchsaufbaus. Die für das Zellrollen relevanten Parameter sollten in einer entsprechenden Durchflußkammer möglichst genau den Bedingungen in den natürlichen Blutgefäßen entsprechen. Im Vordergrund standen dabei die Fließeigenschaften der strömenden Flüssigkeit.

Um laminare Flußbedingungen zu erreichen, wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von Flußkammern beschrieben [129, 130, 131, 132, 133]. Meist wurde dabei auf planare Kammern zurückgegriffen, um eine bessere und genauere Berechnung der physikalischen Bedingungen im Strömungsprofil gewährleisten zu können. Um laminare Fließeigenschaften zu erhalten, müssen jedoch keine bestimmten geometrischen Voraussetzungen erfüllt werden. Allerdings dürfen sich im Bereich der Laminarität keine wirbelerzeugenden Unebenheiten befinden, alle Kammerwände müssen ausgesprochen glatt sein.

In einen transparenten Kunststoffblock wurde die Flußkammer mit den Abmessungen 11x6x0,45 mm herausgefräst. Die untere Gefäßwand der Durchflußkammer bildet ein runder Objektträger aus Glas, der mit einem Metallring und einer Gummidichtung an der Apparatur befestigt wird. Zu- und Abfluß der Kammer bilden quer durch den Kunststoff eingebrachte Bohrungen. Die notwendige Druckdifferenz des Fließmediums zwischen Ein- und Ausfluß wurde hydrostatisch erzeugt, das heißt, ein Flüssigkeitsreservoir befindet sich in einer gewissen Höhe gegenüber dem Ausfluß. Da kleine Luftbläschen eine Modellbiomembran zerstören könnten, befindet sich kurz vor dem Einfluß des Fließmediums in die Kammer eine Blasenfalle, die mit einem Septum verschlossen ist. Durch dieses Septum lassen sich sehr kleine Mengen Flüssigkeit, zum Beispiel eine Zellsuspension, direkt in den Flüssigkeitsstrom injizieren, ohne dabei wesentlich verdünnt zu werden.

Die Eigenschaften dieser Konstruktion verleihen der Durchflußkammer folgende Vorteile:

- Durch die Fixierung der Kammer im Mikroskopisch ist eine Bewegung des Beobachtungsfeldes in x-y-Richtung möglich, außerdem kann die ganze Apparatur mit Hilfe der Mikroskopischheizung temperiert werden.
- Der planare Glasträger als untere Gefäßbegrenzung erlaubt eine direkte mikroskopische Beobachtung aller Ereignisse auf der Glasoberfläche, bei der Verwendung von Glasplättchen mit einer Dicke von höchstens 200 µm sogar mit Immersionsobjektiven.
- Der planare Glasträger erlaubt eine chemische und physikalische Modifizierung der Oberfläche, um eine Biomembran zu simulieren.

- Die geometrischen Abmessungen der Kammer gewährleisten einen planar-laminaren Flüssigkeitsstrom, der mit dem radial-laminaren Blutstrom vergleichbar ist.
- Der fein regulierbare hydrostatische Druck erzeugt einen gleichmäßigen und pulsfreien Flüssigkeitsstrom, wie er auch in den kleinsten Blutgefäßen vorhanden ist [Abbildung 8].

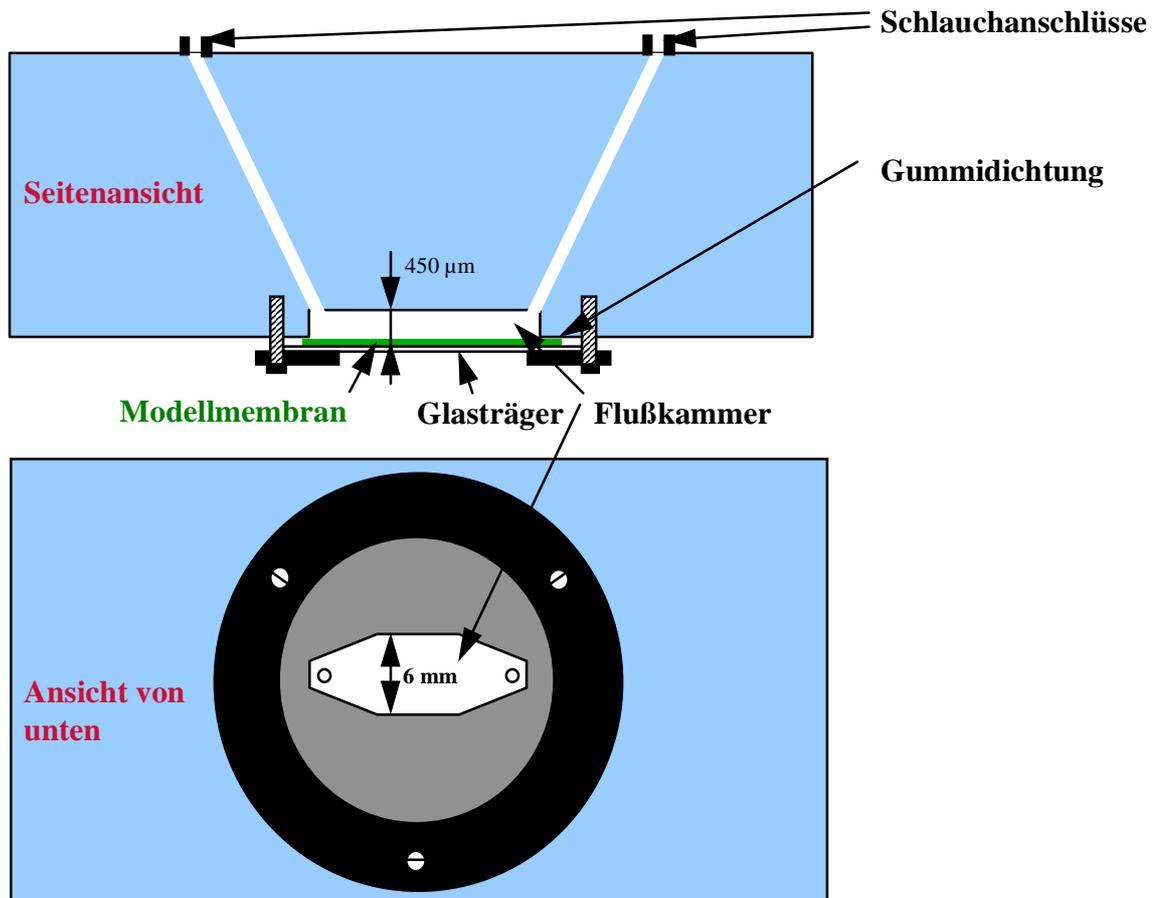


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Durchflußapparatur.

Das Kernstück dieser Apparatur stellt jedoch das Glasplättchen als Träger für die Modellmembran dar. Die Herausforderung bestand in der Modifizierung und Beschichtung des Glases. Es galt, eine Oberfläche zu schaffen, die den empfindlichen Zellrollprozeß vermitteln kann und durch Manipulationen an ihrer Struktur Rückschlüsse auf die Adhäsionsmechanismen zuläßt. Wie im Kapitel 2.4.3 beschrieben, konnten bereits mehrere Arbeitsgruppen ein Zellrollen außerhalb eines Organismus beobachten, dabei wurden jedoch die Adhäsionsmoleküle auf einer festen Unterlage meist durch Eintrocknen fixiert [116, 117]. Da aber eine laterale Beweglichkeit einzelner Moleküle innerhalb einer Biomembran gerade

bei Selektinbindungen von außerordentlicher Bedeutung ist, sollte in unserer Flußkammer eine festkörpergestützte Biomodellmembran (engl.: supportfixed bilayer) verwendet werden. In dieser Lipid-Doppelschicht sollten die korrespondierenden Liganden zum E-Selektin der CHO-E Zellen, wie zum Beispiel natürliche, isolierte Glykolipide oder synthetische Oligosaccharide mit einem Lipidanker inkorporiert und dabei gezielt lateral strukturiert werden. In der folgenden Abbildung sind die Modellmembran und die Verhältnisse in der Durchflußkammer schematisch dargestellt [Abbildung 9].

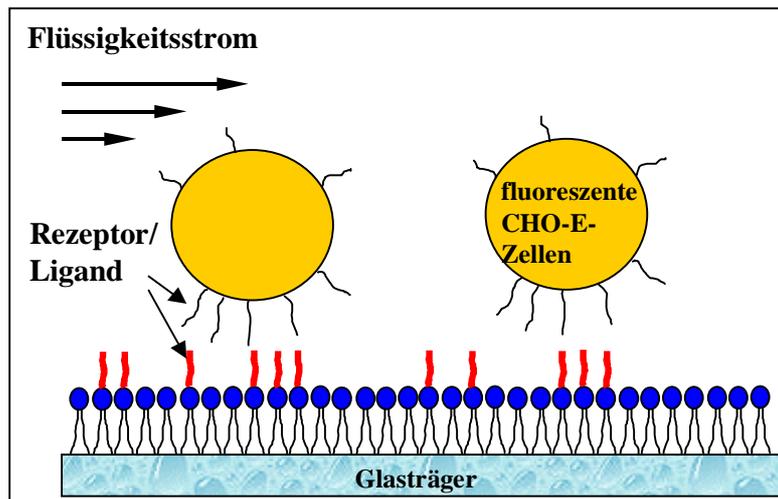


Abbildung 9 Schema der Adhäsionsereignisse selektinexprimierender CHO-E-Zellen und der Modellmembran in der Flußkammer.

Die natürlichen Zellmembranen bestehen aus einer Doppelschicht amphiphiler Membranlipide wie Phospholipide (Phosphatidylcholine, Phosphatidylglycerole aber auch Etherphospholipide), Sphingolipide (Ceramide, Sphingomyelin, Cerebroside und Ganglioside) und Cholesterol. Aufgrund umfangreicher Erfahrungen aus der Literatur und der Arbeitsgruppe bezüglich Herstellung und Fixierung von Modellmembranen wurden Phospholipide als Matrixlipide verwendet.

4.1.3. Herstellung der Modellmembranen

4.1.3.1. Self-Assembling-Technik

Der wesentliche Teil dieser Arbeit bestand in der Entwicklung und Modifizierung einer geeigneten Methode, die Glasträger mit einer ligandtragenden Modellmembran zu

beschichten. Um den Eigenschaften einer natürlichen Zellmembran gerecht zu werden, sollte eine artifizielle Bilayer möglichst von dichter und homogener Struktur sein, vor allem darf sie keine Löcher aufweisen. Das würde zu Artefakten bei Bindungsereignissen mit Zellen führen.

Die Self-Assembling-Technik ist eine Chemisorption, das heißt eine Anordnung von Molekülen an einer Oberfläche zu einem Monolayer unter Ausbildung kovalenter Bindungen .

Diese Methode stellte einen Vorbereitungsschritt in der Erstellung von Biomodellmembranen dar, da sich durch Self-Assembling nur eine einfache Monoschicht erzeugen läßt. Außerdem sind die an Glas gebundenen Lipidmoleküle durch die kovalente Bindung in ihrer lateralen Beweglichkeit behindert und unterscheiden sich somit grundsätzlich von den natürlichen Membranlipiden.

Mit der Self-Assembling-Technik erzeugten wir sehr dicht gepackte hydrophobe Schichten von Hexadecylchlorosilan auf gereinigtem Glas, dabei reagieren die Hydroxygruppen des Glases mit dem Chlorsilan unter Abspaltung von HCl. Der Oberfläche wird auf diese Weise eine ausgeprägte Lipophilie verliehen [Abbildung 10].

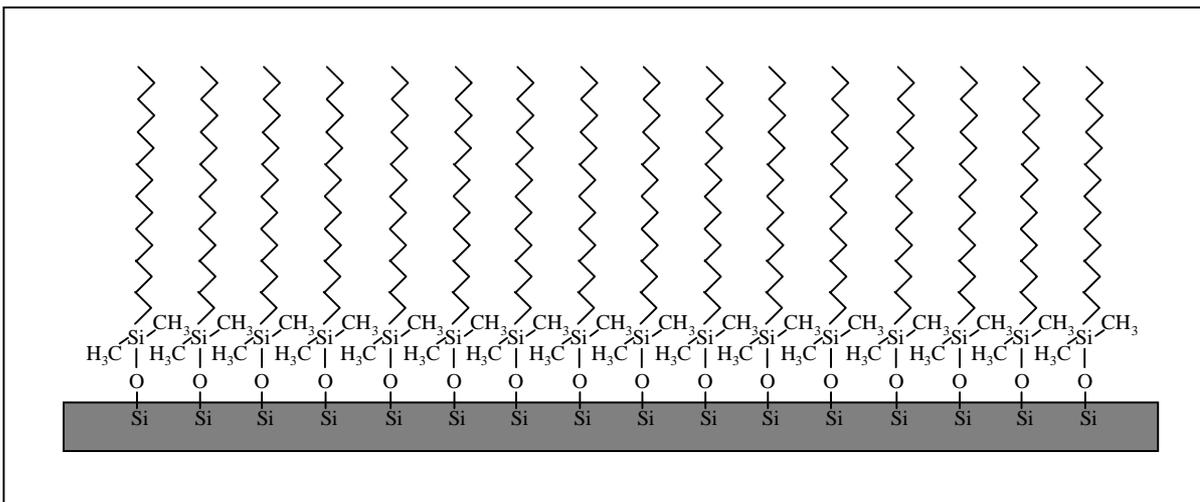


Abbildung 10 Schematische Darstellung eines hydrophobisierten Glasträgers mit Hexadecylsilan.

Zusammen mit den stark hydrophilen Oberflächen der unbeschichteten Glasplättchen standen uns somit zwei unterschiedliche Träger für weiterführende Beschichtungsmethoden zur Verfügung.

4.1.3.2. Vesikelfusionstechnik

Aufgrund früherer Forschungsarbeiten über liposomale Formulierungen in unserer Arbeitsgruppe konzentrierten wir uns bei der Erzeugung der supportfixed bilayer zunächst auf die Vesikelfusionstechnik. Kleine Liposomen von 100-200 nm Durchmesser neigen generell zu einem Verschmelzen untereinander und zum Aufspreiten an Feststoffoberflächen nach einem ähnlichen Mechanismus [Abbildung 11].

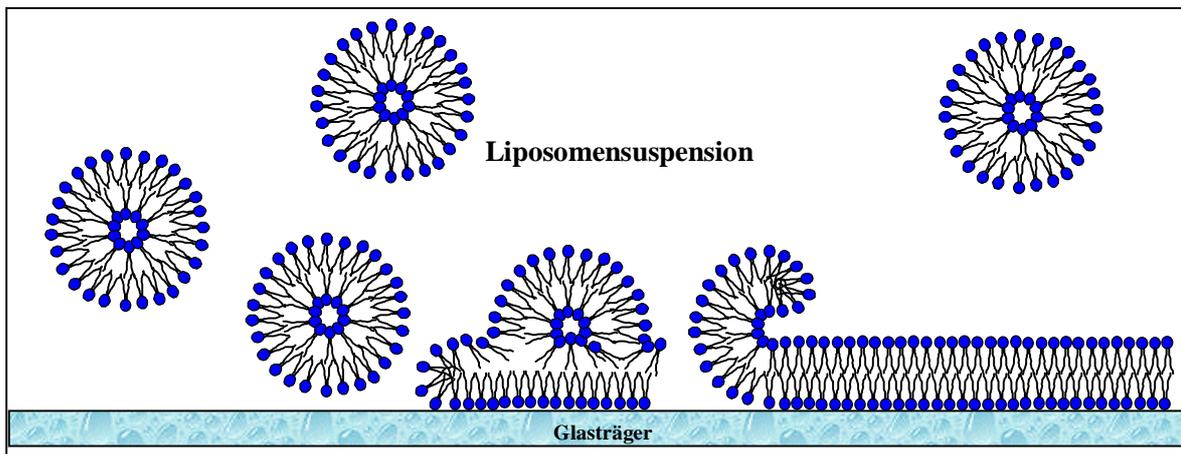


Abbildung 11 Schema der Vesikelfusionstechnik durch das spontane Aufspreiten von Liposomen auf einem Glasträger.

Dieses Aufspreiten erfolgt erfahrungsgemäß spontan und läßt sich durch lösliche Ionen, Krümmungsradius der Vesikel und die Oberflächen- bzw. Lipideigenschaften beeinflussen [134]. Dabei wird in der Literatur über den Vorteil einer stark hydrophilen gegenüber einer stark lipophilen Oberfläche kontrovers diskutiert. Auch der Temperatureinfluß wird nicht einheitlich beschrieben [135]. Hier nicht weiter aufgeführte Experimente zeigten, daß das Aufspreiten oberhalb der Phasenübergangstemperatur der verwendeten Lipide die besten Resultate erbrachte. Die entstandenen Modellmembranen wurden mittels Ellipsometrie auf die Schichtdicke überprüft, und zeigten relativ inhomogene Multilayer. Eine zykovoltammetrische Auswertung der durch Vesikelfusion entstandenen Membranen zeigte auch das Vorhandensein von relativ großen Fehlstellen.

Es wurden mehrere Versuche unternommen, die Qualität der Modellmembran unseren Ansprüchen anzugleichen. Veränderungen der Lipidzusammensetzung der Liposomen, Veränderungen der Hydrophilie/Lipophilie der Substratoberfläche, der Temperatur und

schließlich der Einsatz von entgegengesetzt geladenen Oberflächen und fusiogenen Ionen wie Kalzium führten zu keinen befriedigenden Ergebnissen. In nachstehender Abbildung 12 ist eine Modellmembran dargestellt, die unter Verwendung von negativ geladenen Liposomen und einer positiv geladenen Glasoberfläche entstand.

Das Glasplättchen wurde dazu mit einem Aminopropylsilan beschichtet und ist damit in Abhängigkeit vom pH-Wert des Fließmediums neutral oder positiv geladen. Die Liposomen bestanden aus DSPC:DPPG:NBD-PE (88:10:2), sie sind damit negativ geladen, was ein Verschmelzen untereinander verhindern und die Attraktivität zur positiven Glasoberfläche erhöhen soll. Die dunklen Bereiche stellen Löcher in der Membran bzw. unbeschichtete Flächen dar [Abbildung 12].

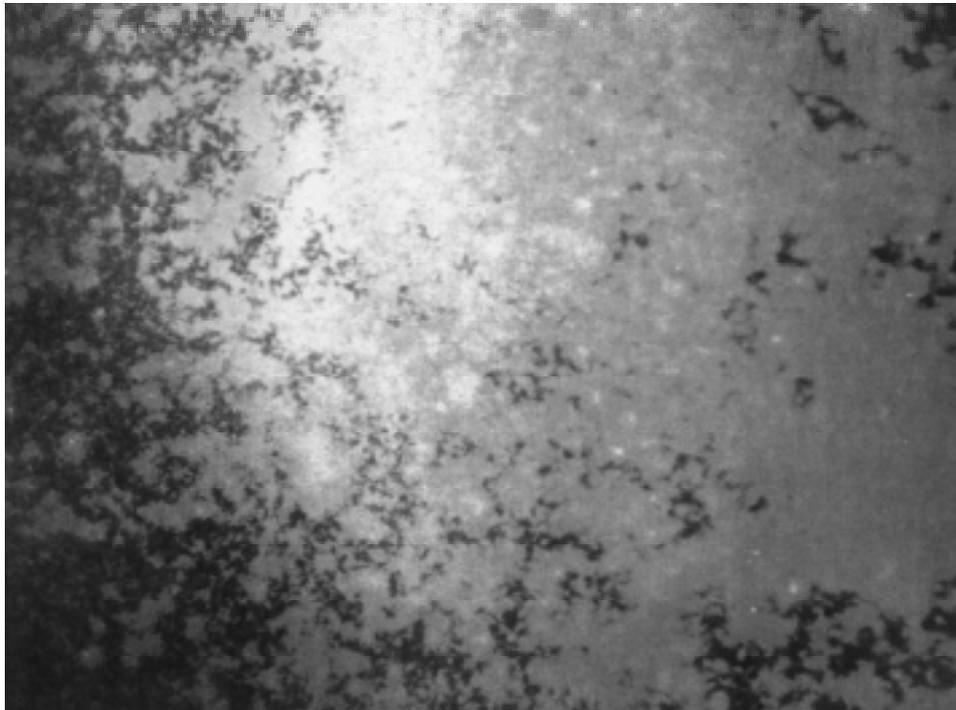


Abbildung 12 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines durch Vesikelfusion beschichteten Glasträgers.

Zyklovoltammetrische Untersuchungen bestätigten das Vorhandensein großer Löcher in der Membran. Außerdem verdeutlichten Untersuchungen mittels Ellipsometer die außerordentlich hohe Schichtdicke bestimmter Bereiche, was auf ein Übereinanderliegen mehrerer Lipidschichten (Multilayer) deutet.

Da selbst unter optimierten Bedingungen keine homogenen Modellmembranen erhalten werden konnten, wurde auf alternative Beschichtungsmethoden, die Self-Assembling- und Langmuir-Blodgett-Methode zurückgegriffen.

4.1.3.3. Langmuir-Blodgett-Technik

Für den größten Teil dieser Arbeit kamen feststofffixierte Modellbiomembranen für die Zellrollexperimente zum Einsatz, die mittels einer Kombination aus Self-Assembling und Langmuir-Blodgett-Technik hergestellt wurden. Bei der Langmuir-Technik wird die Tendenz der Lipide ausgenutzt, sich aufgrund ihrer amphiphilen Struktur an einer Wasser/Luft Grenzfläche spontan zu einem monomolekularen Oberflächenfilm zu organisieren [136]. Durch diese vermittelnden Eigenschaften der Lipide wird die Oberflächenspannung des Wassers gegenüber Luft ($\gamma_0 = 72,5 \text{ mN/m}$ bei 20°C) erniedrigt. Mit Zunahme der molekularen Dichte des Lipids an der Grenzfläche kann die Oberflächenspannung theoretisch bis auf 0 sinken, was einem Lateraldruck von $72,5 \text{ mN/m}$ entspricht.

Mit Hilfe einer sogenannten Filmwaage wurde durch eine bewegliche Barriere ein Lipidfilm an der Wasser/Luft Grenzfläche in einem Langmuir-Trog stetig zusammengeschoben und dabei über ein Wilhelmi-Element die Oberflächenspannung gemessen. Das resultierende isotherme Phasendiagramm ist für jedes Lipid charakteristisch und gibt Auskunft über den Phasenzustand, die Organisation und die Beweglichkeit der einzelnen Lipidmoleküle [Abbildung 13].

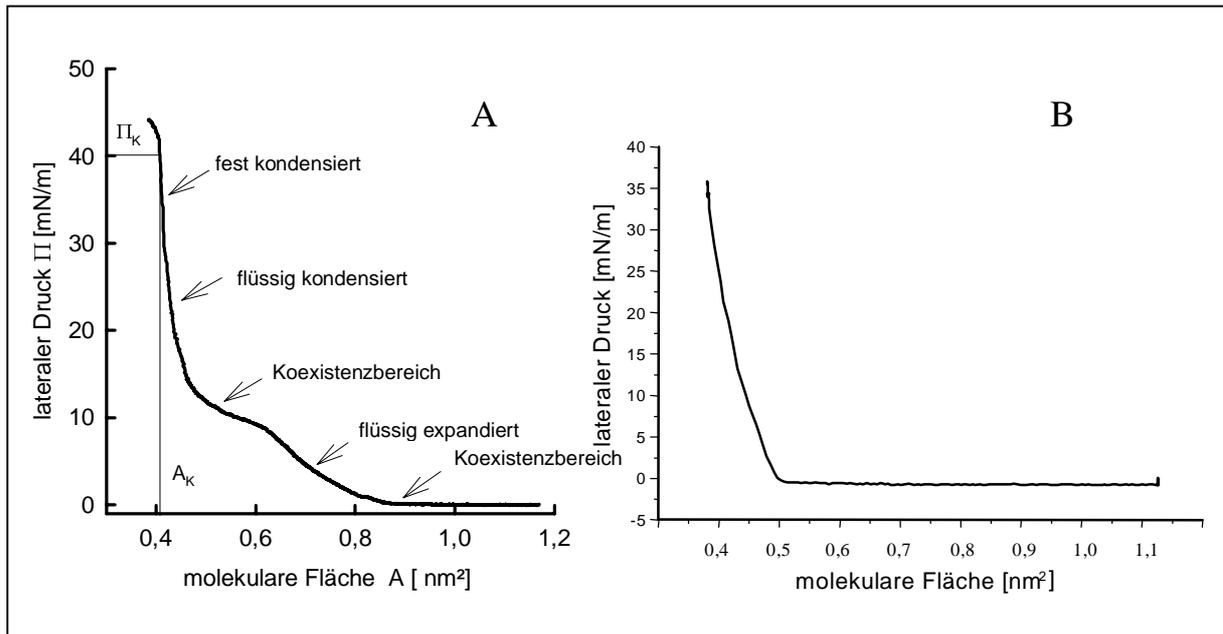


Abbildung 13 A: Druck/Flächen Diagramm von DMPE bei 20°C als Beispiel für das Durchlaufen mehrerer Phasenzustände: Darstellung des Kompressionsverhaltens und Bezeichnung der Phasenzustände Π_K =Kollapsdruck, A_K =Kollapsfläche.

B: Kompressionsverhalten von DSPC bei 20°C als verwendetes Matrixlipid.

Weiterhin haben die Ionenstärke und der pH-Wert der wässrigen Phase sowie Zumischungen von Proteinen oder anderen Lipiden zum Monolayer einen Einfluß auf das Phasenverhalten des Lipidfilms, was intensiv von U. Bakowsky in unserer Arbeitsgruppe untersucht wurde [137].

Der auf der Wasseroberfläche vororganisierte Monolayer wird in einem zweiten Arbeitsgang auf einen Festkörper übertragen (Blodgett-Technik). Die mittels der Self-Assembling-Technik hydrophobisierten Glasplättchen werden dafür aus der Luft durch die Lipidschicht in die Wasserphase hindurchgetaucht. Durch hydrophobe Wechselwirkungen der Festkörperoberfläche mit den Lipiden legt sich bei diesem Vorgang der zweite monomolekulare Lipidfilm auf das Substrat (oberer Layer) [Abbildung 14].

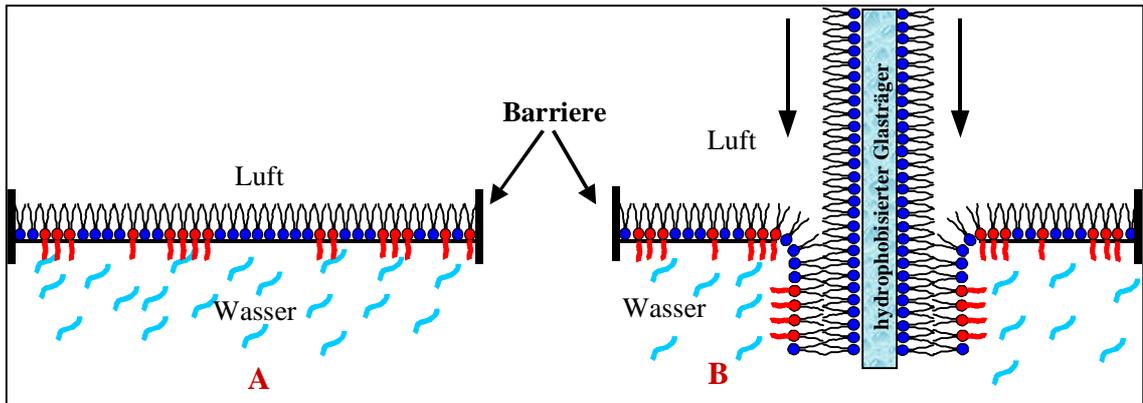


Abbildung 14 Schema der Langmuir-Blodgett-Technik. Im Teil A werden die rot dargestellten Glykolipide mittels einer Barriere in der Lipidmatrix vororganisiert. Dieser Film wird in Teil B auf einen hydrophoben Glasträger übertragen.

Der so entstandene Bilayer besteht aus einem kovalent fixierten und einem adsorptiv gebundenen Monolayer und entspricht somit nicht vollständig einer natürlichen Zellmembran, bei der beide Membranseiten unfixiert sind. Befürchtungen um eine Behinderung der lateralen Beweglichkeit der nach der Langmuir-Blodgett-Technik übertragenen Lipidmoleküle wurden mit der sogenannten FRAP-Methode (Fluorescence Recovery After Photobleaching) aufgeklärt. In den oberen Layer wird ein fluoreszenzmarkiertes Lipid inkorporiert, welches sich mit dem Matrixlipid gut mischt. Mit dem Matrixlipid DSPC und dem Fluoreszenzlabel NBD-PE erhielten wir eine relativ homogen fluoreszierende Modellmembran. Mit Hilfe des hochenergetischen Laserstrahles des Laser-Scanning-Mikroskopes wurde in der Mitte des Beobachtungsfeldes eine kleine quadratische Fläche so stark bestrahlt, bis die Fluoreszenz ausgeblüht war. Das Beobachtungsfeld wurde daraufhin mit abgeschwächtem Laserlicht gescannt und dabei das Wiederauftreten der Fluoreszenz im gelöschten Areal durch laterale Diffusion der Membranlipide beobachtet [Abbildung 15].

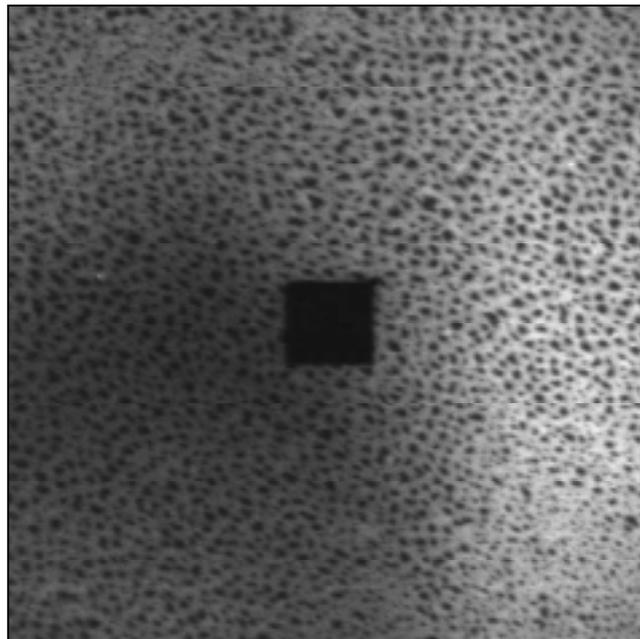


Abbildung 15 Fluoreszenzmikroskopisches Bild einer Modellmembran. In der Mitte befindet sich das ausgebleichte Quadrat. Das Bild hat eine Diagonale von 400 μm .

Das ausgebleichte Quadrat von ca. 40x40 μm fluoreszierte nach 120 Minuten wieder vollständig; das heißt, es hat durch Lateraldiffusion ein vollständiger Austausch der Membranlipide des gebleichten Quadrates mit den ungebleichten äußeren Bereichen stattgefunden [Abbildung 16].

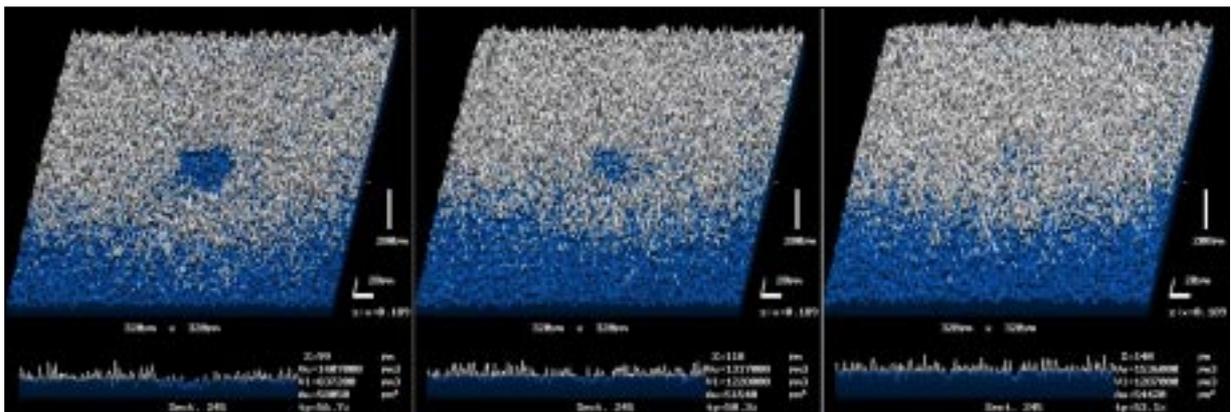


Abbildung 16 Zeitlicher Verlauf der Wiederherstellung der Fluoreszenz durch Lateraldiffusion nach Ausbleichen eines Quadrates in der Mitte. Die Bilder wurden im Abstand von 60 Minuten aufgenommen und in einer topografischen Darstellung abgebildet.

Diese physikalischen Eigenschaften ähneln denen in natürlichen Membranen, auch dort ist durch das Vorhandensein von transmembranären Proteinen und die teilweise Fixierung der Biomembran am Zytoskelett die Lateraldiffusion gebremst. Diese partielle Behinderung übernimmt in unserer festkörpergestützten Modellmembran der kovalent fixierte Monolayer.

Ein wesentlicher Vorteil der Langmuir-Blodgett-Technik besteht in der Möglichkeit, den zu übertragenden Monolayer lateral strukturieren zu können. Unterschiedliche Lipide sind aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften selten miteinander ideal mischbar. Die Ursachen dafür sind zum Beispiel eine unterschiedliche Kopfgruppengröße und deren elektrische Ladung, unterschiedlich lange oder verzweigte Acyl- bzw. Alkylketten und das sich daraus ergebende Phasenverhalten der einzelnen Lipide. Mischt man fluide mit rigiden Lipiden, kommt es zu Entmischungserscheinungen, die bereits auf der Wasseroberfläche mit einer speziellen Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden können. Versetzt man das Lipidgemisch mit einem Fluoreszenzlabel, so reichert er sich, je nach dessen physikalischen Eigenschaften, in fluiden oder rigiden Bereichen bzw. an deren Grenzflächen an. Nachteilig an dieser Charakterisierungsmethode ist jedoch der notwendige hohe Anteil des Fluoreszenzmarkers von 1%. Will man ein Entmischungsverhalten von sehr kleinen zugemischten Lipidkonzentrationen bestimmen, würde eine hohe Fluoreszenzmarkerkonzentration die laterale Struktur der Membran stärker beeinflussen als das zu untersuchende Lipid. In diesen Fällen wurde auf die Rasterkraftmikroskopie zurückgegriffen, die ohne Markermoleküle auskommt.

Da die beschriebenen Entmischungen thermodynamisch getrieben sind, bleiben sie auch nach Übertragung der Monolayer auf einen Festkörper erhalten, eine laterale Diffusion findet nur innerhalb der einzelnen Phasen statt. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an der Wasser/Luft Grenzfläche und am Rasterelektronenmikroskop wurden von Dr. U. Bakowsky in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt [137].

4.1.4. Das Adhäsionsverhalten von Modellzellen in der Durchflußkammer

Für die mikroskopische Detektion von Ereignissen, die sich unter Fließbedingungen an einer Oberfläche ereignen, ist eine geeignete optische Methode von außerordentlicher Bedeutung, da das Erfassen von sich bewegenden Objekten außerhalb der Fokusebene durch Überstrahlung vermieden werden muß. Deshalb entschieden wir uns für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM), eine spezielle Fluoreszenzmikroskopie. Der große Vorteil der konfokalen Lichtmikroskopie besteht in der Möglichkeit, das von einer Probe reflektierte oder emittierte Licht aus einer einzigen Ebene zu sammeln. Eine Lochblende (Pinhole), die zur Fokusebene konjugiert (konfokal) angeordnet ist, sorgt dafür, daß sämtliches Licht, das nicht

aus dieser Ebene stammt, die Lochblende nicht passieren kann und deshalb vom Detektor nicht erfaßt wird. Mit diesem Mikroskop läßt sich exakt auf den Bereich knapp über der Modellmembran fokussieren. Dadurch werden nur Objekte erfaßt, die in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche stehen, alle frei in der Durchflußkammer strömenden Objekte werden nicht detektiert. Beim Laser-Scanning-Mikroskop wird das Bild aus einer Menge von Lichtemissionsdaten zusammengesetzt, wobei die Probe Punkt für Punkt und Zeile für Zeile sequentiell abgetastet wird. Indem man die Fokusebene verschiebt, lassen sich einzelne Bilder (optische Schnitte) zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammensetzen. Zusätzlich lassen sich durch dieses Punkt für Punkt Abrastern der Probe, ähnlich der Nahfeld Mikroskopie, fluoreszierende Objekte auflösen, die gleichgroß oder etwas kleiner als die Lichtwellenlänge sind, so zum Beispiel fluoreszenzmarkierte Liposomen mit einem Durchmesser von ca. 200 nm [Abbildung 17].

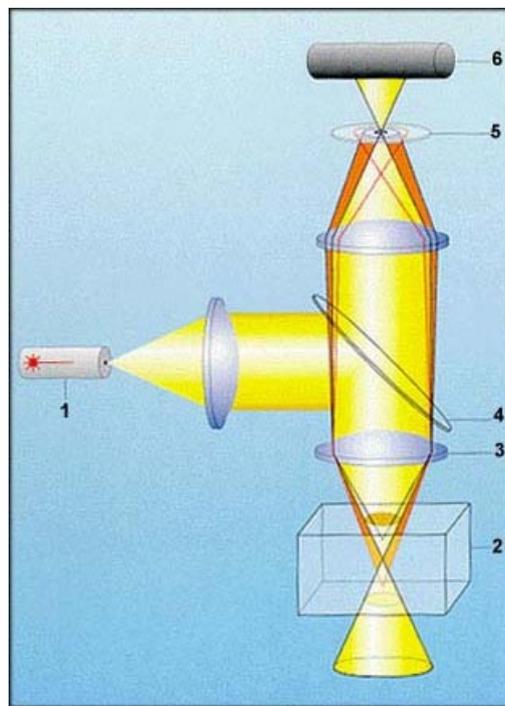


Abbildung 17 Strahlengang in einem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. 1: Laserquelle; 2: Probe; 3: Objektiv; 4: dichroischer Strahlenteiler; 5: Lochblende (Pinhole); 6: Photomultiplier.

Zunächst sollte unser Modellaufbau auf seine Funktionalität und Eignung für selektinabhängige Adhäsionsvorgänge im Scherstrom überprüft werden. Dabei sollte geklärt

werden, ob die schwach affinen Wechselwirkungen in der Durchflußkammer sichtbar gemacht werden können. Als Bindungspartner wählten wir das mannosebindende Lektin Concanavalin A (ConA). ConA besitzt eine analoge Bindungsaffinität zu seinen Saccharidliganden wie die Selektine zum sLe^x, außerdem stand es uns in ausreichenden Mengen zur Verfügung [138]. Erste Untersuchungen führten wir mit liposomalen Formulierungen und beschichteten Mikropartikeln als Modellzellen durch, an die das ConA über einen Lipidanker inkorporiert wurde. In die Modellmembran wurden die entsprechenden Mannoselipide inkorporiert. Die Verwendung von Modellzellen sollte einerseits Erkenntnisse über das Bindungsverhalten von Selektinen im Scherstrom und deren Detektierbarkeit in der Durchflußkammer erbringen, andererseits werden so nicht-pektinspezifische Interaktionen von natürlichen Zellen mit der mannosehaltigen Zellmembran unterdrückt.

Als Modellzellen stellten wir unilamellare Liposomen mit einem Durchmesser von ca. 300-350 nm her. Als kovalenter Bindungspartner für das ConA wurde der Lipidanker N-Glutaryl-PE in die Lipidmatrix (DSPC:Chol:N-Glutaryl-PE:NBD-PE 59:30:10:1) inkorporiert. Nach der Kopplung des ConA an die Liposomen wurde die Funktionalität des ConA mit mannosyliertem Albumin nachgewiesen. Binden mehrere Vesikel an eine glykosyliertes Albuminmolekül, kommt es zu einer Liposomenagglutination, die mittels einer Trübungsmessung nachgewiesen wurde.

Die eigentlichen Bindungspartner für die funktionalisierten Liposomen in der Durchflußkammer waren Alkylmannoside, die in die Modellmembran eingebaut wurden. Die monosaccharidischen Kopfgruppen der Liganden besitzen einen unterschiedlich langen Abstandshalter (Spacer) aus 0, 3 oder 8 Ethoxyeinheiten zum lipophilen Molekülteil. Dadurch ragen die Zuckerreste unterschiedlich weit aus der Modellmembran heraus. Die Mannoside wurden zu 10% mit der DSPC Matrix der Modellmembran gemischt und bei einem Lateraldruck von 38 mN/m übertragen. Unter diesen Bedingungen liegt das Mannosid in entmischter Form in der Lipidmatrix vor, da sich DSPC in einem rigiden Phasenzustand befindet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden helle Areale von 5-10 µm sichtbar, dabei handelte es sich um die fluiden Glykolipide, in denen sich der ebenfalls fluide Fluoreszenzmarker verteilt hatte.

Ein ähnliches Bild ergab sich nach der Übertragung des Filmes auf den Glasträger. Um die Bindungsfähigkeit der Liganden zu beweisen, wurde die Modellmembran in der Durchflußkammer mit FITC markiertem ConA inkubiert, es waren ähnlich große Mannosidcluster wie auf der Wasseroberfläche zu erkennen [Abbildung 18].

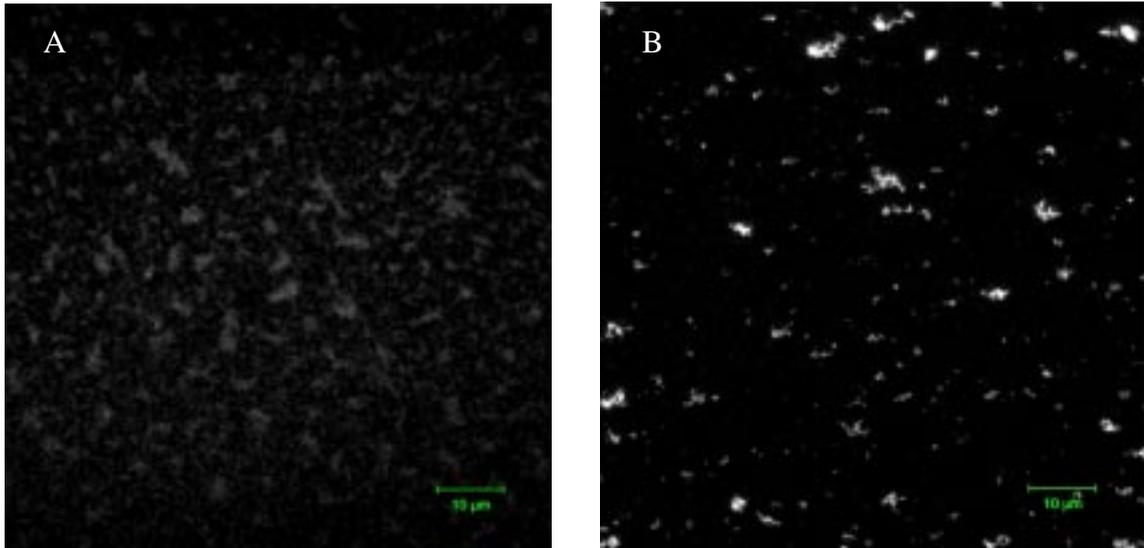


Abbildung 18 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Monolayers mit 10% eines Mannosids: Bild A auf Wasser/Luft Grenzfläche (Fluoreszenzmarkierung mittels NBD-PE) und in Bild B nach der Übertragung auf Glas (nach Inkubation mit FITC-markiertem ConA).

Die Liposomen-Adhäsionsexperimente unter Flußbedingungen wurden mit NBD-PE gelabelten Vesikeln durchgeführt, die Modellmembran war nicht markiert. Bereits nach kurzem Spülen der Flußkammer waren die hellen Punkte der adhärennten ConA-Liposomen zu erkennen. Nach 30 minütigem Spülen mit vesikelfreiem Puffer waren die vorher punktförmigen Fluoreszenzen als helle Flächen zu erkennen. Selbst längeres Spülen mit 0,1 M α -Methylmannosid, welches die Mannosidbindung zum ConA verdrängt, vermochte die Adhäsion der Liposomen nicht wieder zu inhibieren. Das legt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um ein Aufspreiten der Liposomen handelt, wie es bereits in Kapitel 4.1.3.2 beschrieben wurde.

Um diese unspezifischen Wechselwirkungen auszuschließen, wurden mehrere Modifikationen bei der Membran- und Liposomenherstellung vorgenommen. Elektrostatische Abstoßungskräfte durch den Einbau von 10 mol% des negativ geladenen DPPG können ein Aufspreiten der Vesikel nur unwesentlich unterbinden. Werden bei der Herstellung der Vesikel Lipide mit Polyethylenglycol-Kopfgruppen verwendet, erhält man sogenannte Stealth[®]-Liposomen. Die Polyethylenglykolketten verschaffen den Liposomen eine Abschirmung gegen Wechselwirkungen mit der Umgebung ähnlich der Glykokalix bei

natürlichen Zellen. Wir verwendeten PEG-PE 2000 mit einer Länge von ca. 5 nm, was ungefähr der Ausdehnung von ConA entspricht. Die so sterisch stabilisierten Vesikel zeigten bei optimierten 4 mol% PEG-PE 2000 eine deutlich geringere Bindungstendenz, jedoch war die Adhäsion der Liposomen teilweise inhibierbar.

Diese Arbeiten (Herstellung und Charakterisierung einer Modellmembran und ihre Verwendung in einem dynamischen Adhäsionsassay mit modifizierten Liposomen als Modellzellen) konnten 1997 in *Biochim. Biophys. Acta* veröffentlicht werden [139].

Eine weiterführende, neuartige Optimierung der Liposomen wurde mit der Ausbildung eines starren Kerns im Innenraum der Vesikel angestrebt. Dabei sollte ein Polymer teilweise mit Ankermolekülen in der inneren Membran verbunden sein und somit, ähnlich einem Zytoskelett natürlicher Zellen, die Liposomen stabilisieren und ein Aufspreiten verhindern. Die Wechselwirkungen des Polymers mit dem inneren, negativ geladenen Monolayer wurde durch die Verwendung eines kationischen Monomers erreicht. Im Hinblick auf die Verformbarkeit einer natürlichen Zelle im Rollprozeß wurde das Polymer durch Zugabe unterschiedlicher Mengen des Vernetzers (N,N'-Methylenbisacrylamid) in seiner Elastizität beeinflusst. Diese Liposomen wurden zunächst konventionell, wie in Kapitel 3.5 beschrieben hergestellt, allerdings unter Zugabe des Monomers und des Vernetzers. Anschließend wurden die löslichen Substanzen außerhalb der Vesikel gelchromatographisch entfernt. Nach der UV-induzierten Polymerisation wurde das ConA wie oben beschrieben an den äußeren Monolayer gekoppelt. Dieser Polymerkern im Inneren der Liposomen konnte bei den Adhäsionsexperimenten ein sichtbares Aufspreiten weitgehend verhindern, die Bindungen waren jedoch wiederum nicht inhibierbar. Dies deutet auf unspezifische Wechselwirkungen der Lipide von Vesikel- und Modellmembran hin, die sich durch den festen Kern allerdings auf die Kontaktfläche der Kugel beschränkten. Ähnliche Ergebnisse erzielten wir bei der Verwendung von Melamin-Feststoffpartikeln als Modellzellen. Diese Partikel wurden nach der Vesikelfusionstechnik (Kapitel 3.6) durch ConA-haltige Liposomen mit einer Modellmembran überzogen [140].

Die Summe dieser einführenden Experimente brachte uns grundlegende Erkenntnisse über unsere Durchflußkammer und Adhäsionsvorgänge im Scherstrom. Die Arbeiten wurden von einer ständigen Verbesserung und Optimierung des Modellsystems begleitet. Durch die Erfahrungen im Umgang mit einer Modellmembran und deren Empfindlichkeit wurde die bereits erwähnte Blasenfalle entwickelt und die Temperierbarkeit der Kammer durch ein spezielles Gebläse im Mikoskoptisch verbessert. Der frühere Gebrauch einer Peristaltikpumpe für die Erzeugung des Scherstromes führte zu einem pulsartigen Druckverlauf in der Flußkammer, was in einer leichten Auf- und Abbewegung des Glasplättchens samt

Modellmembran resultierte. Durch die konfokalen Eigenschaften des Mikroskopes genügen jedoch einige Nanometer Verschiebung in der z-Achse, und das Objekt befindet sich außerhalb der Fokusebene und ist damit nicht mehr detektierbar. Nachdem auch die Verwendung von langen weichen Schläuchen und verschiedenen Peristaltikpumpen keine Verbesserung brachte, wurde der für den Scherstrom notwendige Druck hydrostatisch erzeugt. Durch Höhenverstellung des Flüssigkeitsreservoirs war es auch möglich, den Scherstrom sehr fein zu regulieren. Außerdem war es im Gegensatz zu Kolbenpumpen möglich, durch ständiges Auffüllen des Fließmediums einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom zu gewährleisten.

Mit dieser optimierten Apparatur war es uns möglich, eine lektinspezifische Adhäsion von Modellzellen an einer Modellmembran unter Scherbedingungen reproduzierbar zu realisieren. Der komplizierte Zellrollprozeß konnte unter diesen Bedingungen dagegen nicht erzeugt werden. Die Ursachen dafür sind in einer schlecht zu steuernden Elastizität, der Instabilität der Modellzellen und der abweichenden Bindungskinetik des Systems ConA-Mannosid zu Selektin-Selektinligand zu suchen. Diese Tatsachen bekräftigen die Annahme, daß das Zellrollen als Sonderform der Adhäsion die spezifische Bindungskinetik der Selektine und ihrer Liganden voraussetzt und nicht durch andere Rezeptor-Ligand-Systeme ersetzt werden kann. Der Einsatz lebender Zellen mit ihren Eigenschaften einer extremen, reversiblen Verformbarkeit scheint zudem unumgänglich.

4.2. Zellrollexperimente

Um ein Zellrollen zu induzieren, wurden die bereits gewonnenen Erfahrungen der beschriebenen Adhäsionsexperimente auf ein System mit selektinexprimierenden Zellen und sLe^x-Lipide als Selektinliganden in der Modellmembran übertragen. Die Verwendung von Glykolipiden statt der natürlichen Mucinliganden ist eine Voraussetzung, um Aussagen über die Notwendigkeit einer lokalen Konzentrierung der Adhäsionsmoleküle für das Zellrollen treffen zu können. Das Ziel bestand zunächst in der Schaffung von Modellmembranen, die mittels inkorporierter Glykolipide ein Zellrollen vermitteln können.

Zunächst standen uns durch eine Zusammenarbeit mit der Universität Bielefeld aus Granulozyten extrahierte sLe^x-Glykosphingolipid-Mischungen zur Verfügung, die mittels einer sLe^x-affinen Chromatographie aufgereinigt wurden [122, 123]. Diese wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit DSPC gemischt und als Modellmembran auf Glasplättchen übertragen. Die Sphingolipide befinden sich bei der Übertragung bei 38 mN/m im Gegensatz zum DSPC in einem fluiden Phasenzustand und sind deshalb im Fluoreszenzmikroskop als Entmischungsareale zu erkennen. Die fluoreszierenden CHO-E

Zellen wurden in den Flüssigkeitsstrom mit einem Schergrad von 200 s^{-1} injiziert, was einem unteren Wert des kapillaren Blutstromes entspricht. Um möglichst viele Zellen im Beobachtungsfeld mit der Modellmembran in Interaktion treten zu lassen, wurde der Scherstrom für fünf Minuten unterbrochen, sobald die Zellen die Flußkammer erreicht hatten. Nach erfolgter Sedimentation der Zellen wurde das Spülen fortgesetzt.

Bei einer Konzentration der Glykosphingolipide von 5-15 % in DSPC gingen die CHO-E Zellen in eine rollende Bewegung über. Das Zellrollen ist dabei nicht als eine gleichförmige Bewegung sondern als ein unstetes Rucken erkennbar, das auch nicht immer exakt in Strömungsrichtung verläuft, da die Bindungen immer nur an den Ligandenclustern stattfinden.

Bei höheren Konzentrationen blieben die meisten Zellen fest adhärirt, während bei niedrigen Konzentrationen keine Wechselwirkungen zu beobachten waren. Die nichttransfizierten CHO Zellen interagierten in keinem Fall mit der Modellmembran. Da sich CHO und CHO-E Zellen bis auf die Expression von E-Selektin gleichen, konnten wir erstmals ein selektinvermitteltes Zellrollen in unserer Durchflußapparatur aufzeigen.

Um den Zellrollvorgang charakterisieren zu können, mußte eine Möglichkeit der Dokumentation gefunden werden. Dazu wurden die mikroskopischen Bilder alle zwei Sekunden über einen Zeitraum von mindestens 40 Sekunden auf einem Computer abgespeichert. Diese Methode ist ein Kompromiß aus Bildqualität und Leistungsfähigkeit der Rechentechnik, je schneller man scannt, um so kleiner müssen die abzuspeichernden Bilddateien sein. Außerdem verschlechtert sich die Bildauflösung bei einer Scandauer unterhalb von 2 Sekunden drastisch, da der Laser dann ein größeres Abtastraster benutzt. Ein einzelnes mikroskopisches Bild während des Zellrollexperimentes ist in [Abbildung 19] dargestellt.

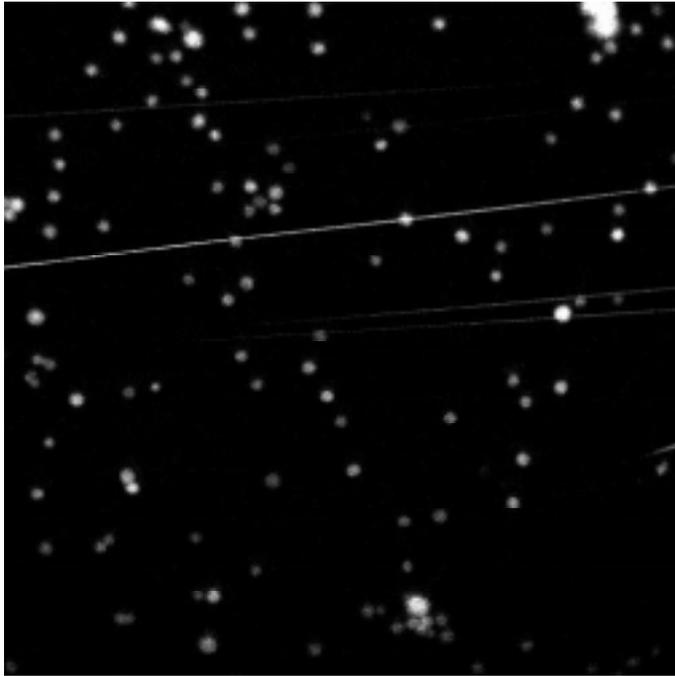


Abbildung 19 Fluoreszenzmikroskopisches Bild des Zellrollvorganges. Alle mit der Zellmembran in Wechselwirkung stehende Zellen erscheinen als helle Flächen. Die frei im Medium fließenden Zellen erscheinen als helle Streifen. Die Bilddiagonale beträgt 900 μm .

Die fest adhärirten und die rollenden Zellen sind als runde Flächen zu erkennen. Ob sich eine Zelle rollend bewegt oder nicht, ist aus einem einzigen Scan nicht abzulesen, da die Zellrollgeschwindigkeit viel zu gering gegenüber der Scangeschwindigkeit ist, um das Abbild der rollenden Zelle als langgezogene Ellipse oder gar einen langen Streifen darstellen zu können. Die erkennbaren langgezogenen hellen Streifen repräsentieren diejenigen Zellen, die sich in unmittelbarer Nähe der Membranoberfläche im freien Fluß bewegen. Sie treten in keinerlei Wechselwirkungen mit der Modellmembran, ihre Geschwindigkeit entspricht der des fließenden Mediums.

Die aufgezeichneten Bildsequenzen wurden hauptsächlich unter zwei Gesichtspunkten ausgewertet:

a) Die einfache Auszählung der hellen runden Flächen nach einem bestimmten Zeitpunkt des Spülens gibt Auskunft über den Anteil der Zellen, die in irgendeiner Weise mit der Modellmembran in Wechselwirkung stehen. Dabei wird nicht erfaßt, ob sich die Zelle rollend fortbewegt oder fest adhäririert. Diese Auswertungsmethode entspricht einem klassischen Zelladhäsionsassay unter statischen Bedingungen, bei dem eine bestimmte Anzahl von Zellen

mit einem Substrat inkubiert und nach einem Spülvorgang wieder ausgezählt wird. Mit dieser Methode lassen sich jedoch keine Aussagen über den Zellrollvorgang selbst treffen.

b) Um das Rollen der Zellen nachzuweisen und zu charakterisieren, mußten die einzelnen Bilder der gesamten Sequenz untereinander verglichen werden. Am effizientesten erwies sich dabei die Arbeitsweise, immer drei aufeinanderfolgende Bilder gleichzeitig zu bearbeiten. Durch das Mikroskop wurden Schwarz-Weiß-Dokumente erstellt, das heißt, die schwarzen Bereiche besitzen den Farbwert 0 und die weißen Bereiche der fluoreszierenden Zellen den Wert 1. Mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogramms wurde den drei Bildern dann jeweils eine der drei Grundfarben Rot, Grün oder Blau aufgeprägt. Die Werte 0 für Schwarz bleiben in jedem Bild erhalten und repräsentieren weiterhin Schwarz. Die weißen Bereiche werden jedoch eingefärbt. Die Zellen im ersten detektierten Bild erscheinen dann rot, im zwei Sekunden später aufgenommenen Bild grün, und im letzten Bild sind sie als blaue Flecken zu erkennen. Legt man die so gefärbten Bilder übereinander, läßt sich der Weg, den eine Zelle über die Modellmembran zurücklegt sehr gut verfolgen. Mittels einer Abstandsmessung der farbigen Flecken gleicher Zellen und der Zeitdifferenz zwischen den Einzelbildern kann dann auf die Zellrollgeschwindigkeit geschlossen werden. Bei den fest adhärenierten Zellen mit der Geschwindigkeit 0 befinden sich alle drei Grundfarben am selben Ort und ergeben Weiß [Abbildung 20].

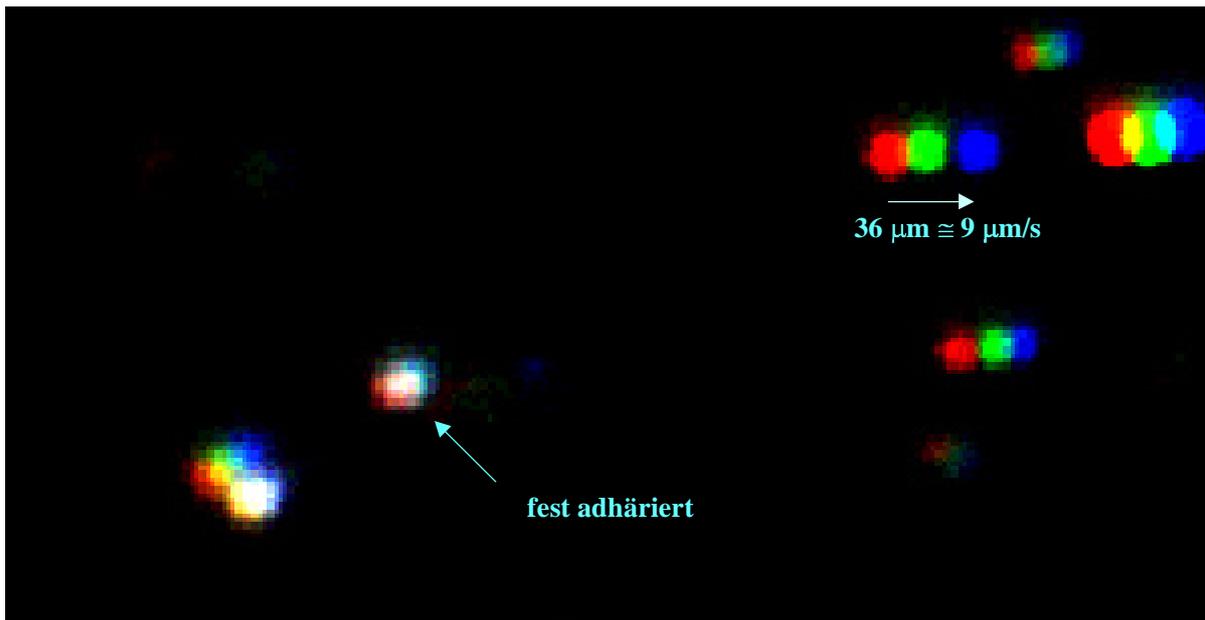


Abbildung 20 Überlagerung von drei zeitlich aufeinanderfolgenden Falschfarbenbildern während eines Zellrollexperimentes.

Aus dieser Darstellung geht ebenfalls hervor, daß die Zellen in ihrer Rollbewegung der Fließrichtung nicht exakt folgen, sondern ungeradlinig und ruckartig fortbewegt werden.

Diese beiden Methoden zur Auswertung der Rollexperimente ergänzten sich und wurden generell parallel durchgeführt. Generell konnte festgestellt werden, daß eine Verringerung der Ligandenkonzentration in der Modellmembran einen Anstieg der Rollgeschwindigkeit bewirkt, was aber auch eine Erniedrigung der insgesamt interagierenden Zellen zur Folge hatte.

Leider ist eine quantitative Aussage mit diesen Experimenten nicht möglich, da die absolute Konzentration der saccharidischen Bindungsepitope in dem Glykolipidextrakt nicht bekannt ist.

4.2.1. Einfluß der Ligandenverteilung und -konzentration

Die bisher verwendeten Sphingolipide wurden mittels einer sLe^x-affinen Chromatographie aus einem Granulozytenextrakt aufgereinigt [122]. Dennoch besitzen wir keine Kenntnis über die exakten Strukturen der Kopfgruppen und Anker-Molekülteile. Auch die Anwesenheit anderer, Nicht-sLe^x-Strukturen kann nicht ausgeschlossen werden, da Bindungsspezifitäten an Oligosacchariden wesentlich geringer sind als bei Protein-Protein-Wechselwirkungen (siehe auch Kapitel 2.3.4). Deshalb muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei den Extrakten um ein Gemisch von Lipiden handelt, bei denen sLe^x oder aber auch leicht modifizierte sLe^x-Derivate in der Affinitätschromatografie zu einer Separation geführt haben.

Präzise Aussagen über den Einfluß einzelner Selektinliganden auf den Rollprozeß lassen sich nur mit einem chemisch genau definierten System treffen. Deshalb wurden im weiteren Verlauf der Arbeiten unsere bisherigen Erfahrungen in der Modellanordnung auf ein System mit synthetischen Selektinliganden übertragen. In einer Zusammenarbeit mit der Universität Konstanz konnten wir zunächst auf ein Ceramid zurückgreifen, dessen sLe^x-Kopfgruppe über einen Laktosespacer mit dem Ankermolekül verbunden ist, bei einer Vergleichssubstanz, die als Kontrolle dienen sollte, besteht die Kopfgruppe nur aus der Neuraminsäure [125] [Abbildung 21].

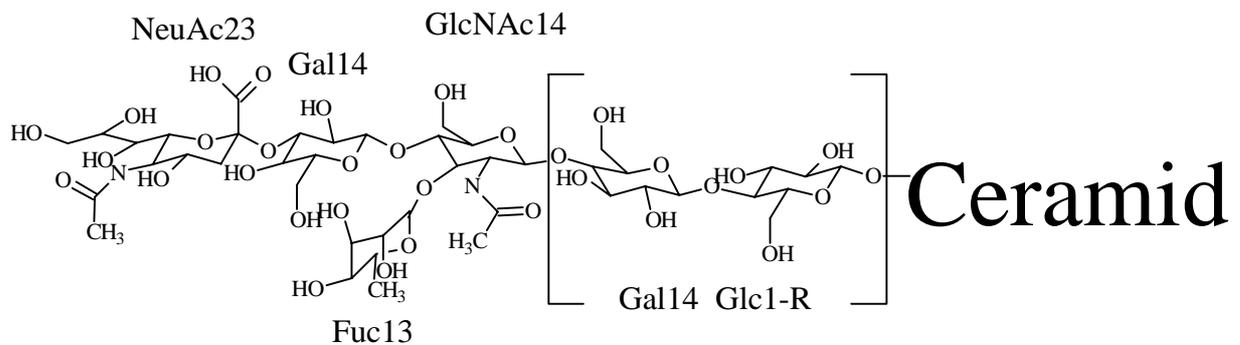


Abbildung 21 Sialyl Lewis^X-Lipid mit Laktosespacer und Ceramidanker;[(2S,3R,4E)-2-amino-3-hydroxy-2-(N-palmitoyl)-octadec-4-en-1-yl]-D (Kalium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galakto-2-nonulopyranosylat)-(2 \rightarrow 3)-(β -D-galaktopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-(β -D-galaktopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosid.

Mit diesen Verbindungen sollte überprüft werden, inwieweit der komplizierte Zellrollprozeß auch mit einfachen und definierten synthetischen Liganden simuliert werden kann, um daraus Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen zu ziehen.

Für die Beantwortung unserer ursprünglichen Fragestellung nach dem Einfluß von absoluter Konzentration und einer lateralen Strukturierung der Ligandenmoleküle in einer Modellmembran wurde das physikochemische Verhalten des Ceramids in verschiedenen Lipidmatrices untersucht. Das Ziel dabei bestand darin, verschiedene Modellmembranen zu schaffen, in der das Glykolipid bei gleicher Konzentration unterschiedlich lateral strukturiert vorliegt. Einer homogenen Verteilung des Glykolipids sollten Membranen mit kleinen und großflächigen Clustern gegenüberstehen.

Um die Vergleichbarkeit der Membranen untereinander zu erhöhen, wurde zunächst versucht, in einem einzigen Matrixlipid durch unterschiedliche physikalische Parameter, wie Druck und Temperatur die Glykolipide in die gewünschten Lateralmuster zu zwingen. Das gewählte DMPC ist bei Raumtemperatur und einem Lateraldruck von 38.40 mN/m an der Wasser/Luft Grenzfläche nicht mit dem Ceramid mischbar, da sich das Matrixlipid im Gegensatz zum Ceramid in einem rigiden Phasenzustand befindet. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in der wesentlich größeren Kopfgruppe des Ceramids. Durch eine Temperaturerhöhung auf 40°C wurde DMPC in einen fluiden Phasenzustand überführt und

damit eine vollständige Mischbarkeit mit dem Ceramid erreicht. Der so vorgefertigte Film ließ sich allerdings sehr schlecht, mit einem Übertragungsverhältnis von unter 0,3 auf das Glas übertragen. Ein zweiter Ansatz bestand in der Blodgett-Übertragung eines rigiden, geclusterten Monolayers bei Raumtemperatur, es folgte ein nachträgliches Aufschmelzen der Modellmembran bei 40°C und eine Homogenisierung der Ceramidstrukturen durch Lateraldiffusion. Auf diese Weise erhielten wir zwei verschieden strukturierte Modellmembranen. Allerdings benötigte die Lateraldiffusion der Lipide nach Aufschmelzen der Membran mindestens drei Stunden. Bei für Mikroorganismen günstigen Lebensbedingungen von 40°C reichten in dieser Zeit oft wenige Keime für eine teilweise Zerstörung des Lipidmonolayers. Außerdem wurden die Zellrollexperimente bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt, was zu einer teilweisen Schmelze des rigiden, geclusterten Systems und zur einsetzenden homogenisierenden Lateraldiffusion führte. Ein Bindungsassay bei unterschiedlichen Temperaturen wäre als Alternative nicht aussagekräftig.

Für die Erzeugung stabiler und reproduzierbar strukturierter Modellmembranen entschieden wir uns schließlich für den Einsatz von unterschiedlichen Matrixlipiden mit verschiedenen physikochemischen Eigenschaften. Für das System mit einer homogenen Ligandenverteilung wählten wir als Matrixlipid POPC. Bei einer Zumischung von 1mol% Ceramid zum fluiden POPC findet man erwartungsgemäß sowohl an der Wasser/Luft-Grenzfläche als auch auf dem übertragenen Monolayer fluoreszenzmikroskopisch keine Entmischungserscheinungen (die Menge von 1% ergibt sich aus unten beschriebenen Konzentrationsfindungen für ein funktionierendes Zellrollen).

Mischt man die gleiche Menge Glykolipid DSPC zu, so sind deutliche Clusterbildungen zu beobachten. Die Entmischungen sind als winzige helle Punkte unter dem Fluoreszenzmikroskop zu erkennen. Da der Fluoreszenzmarker die Clusterbildung selbst verursachen könnte, wurde der DSPC-Film mit 1% Ceramid mittels AFM untersucht [Abbildung 22].

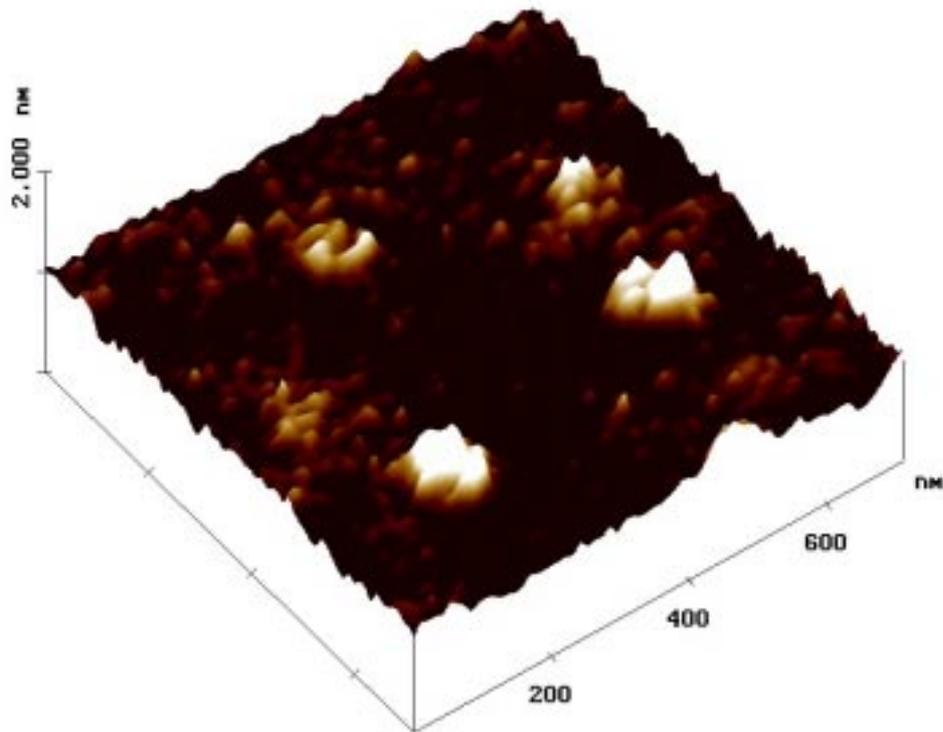


Abbildung 22 AFM-Aufnahme eines DSPC Modellmembran mit 1% sLe^x-Cer. Die Glykolipidcluster sind als helle Erhebungen erkennbar.

Die in der AFM-Aufnahme erhobenen Bereiche stellen die Ceramidcluster mit einer Fläche von ca. 300 nm² dar. Der Flächenbedarf eines Ceramidmoleküls beträgt ca. 0,6 nm², theoretisch besteht dieses Cluster also aus ca. 500 Glykolipidmolekülen. Da aber die detektierten Clusterareale weit mehr als 1% der Gesamtoberfläche einnehmen, geht man davon aus, daß es sich hierbei um Mischflüssigkristalle aus 1 Molekülteil Ceramid und ca. 10 Teilen DSPC handelt (unterschiedlicher Platzbedarf der Moleküle berücksichtigt). Ein interessanter Effekt dieser Membranen äußert sich in konstanter Größe der Cluster bei unterschiedlicher Ceramidkonzentration; es ändert sich nicht die Größe, sondern die Anzahl der Entmischungen.

Um einen Einfluß auf die Größe der Cluster bei gleicher Ceramidkonzentration zu bekommen, verwendeten wir DSPC als Matrixlipid und POPC als Hilfslipid. In einem Lipidmix aus DSPC:POPC:sLe^x-Cer zum Beispiel (94:5:1) separiert sich POPC in relativ großen fluiden Bereichen. Das Ceramid reichert sich gemäß seinen physikochemischen

Eigenschaften im POPC an. Die Größe der Ceramidanreicherungen kann somit über die Menge des verwendeten Hilfslipids POPC gesteuert werden.

Die so erzeugten Modellmembranen sind leicht reproduzierbar herstellbar, selbst das fluide System POPC-Ceramid legt sich mit einem Übertragungsverhältnis von nahezu 1 auf den Glasträger. In den folgenden Abbildungen sind die drei Möglichkeiten einer lateralen Ligandenstrukturierung gegenübergestellt, die gleichmäßige Verteilung der Glykolipide in der POPC-Membran ist dabei nur schematisch dargestellt [Abbildung 23].

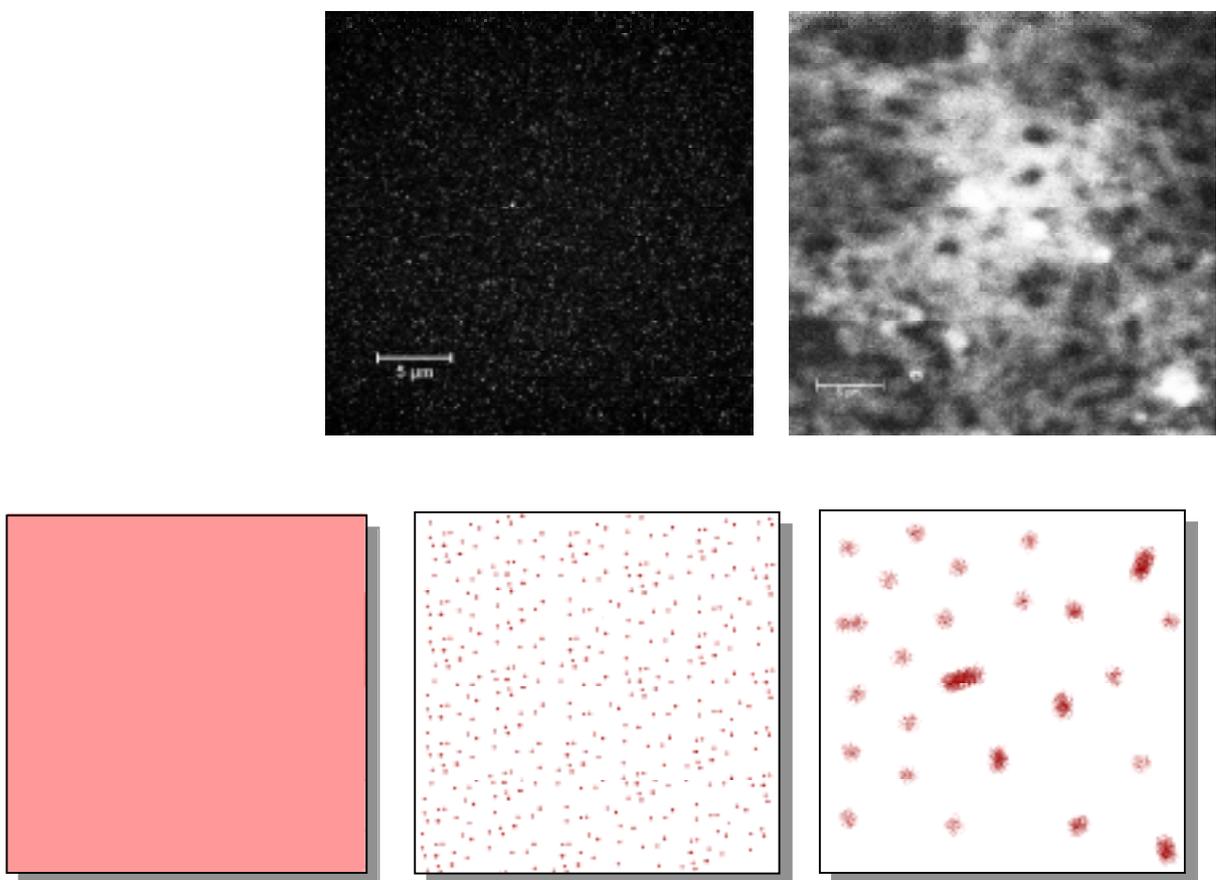


Abbildung 23 Oben: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Verteilung von 1% Glykolipid in der Modellmembran mit dem Matrixlipid DSPC (links) und DSPC/POPC 95:5 (rechts).

Unten: Schematische Darstellung verschieden strukturierter glykolipidhaltiger Modellmembranen.

Die ersten Untersuchungen wurden unter Verwendung des reinen DSPC als Matrixlipid für das Ceramid durchgeführt. Über eine absolute Konzentration der Selektinliganden bzw. des saccharidischen Bindungs epitops sLe^x pro Oberflächeneinheit von Neutrophilen gibt es in der Literatur Schätzungen von 50.000/ μm^2 [141]. Darauf beziehend und in Anlehnung an die Versuche unter Verwendung der natürlichen Sphingolipide wurde deshalb mit 10% sLe^x-Cer in der DSPC-Matrix ein Rollen der CHO-E Zellen versucht zu induzieren. Dieses Experiment führte zu einer sehr festen und nahezu vollständigen Adhäsion der Zellen auf der Modellmembran. In einer Reihe weiterer Versuche zur Konzentrationsfindung wurde der sLe^x-Cer Anteil Schritt für Schritt verringert. Überraschenderweise wurde ein Zellrollen erst ab einer Glykolipidkonzentration von 0,05% beobachtet. Eine Gegenüberstellung all dieser Experimente ist in folgender Tabelle dargestellt [Tabelle 2].

Glykolipid-Konzentration [%]	Zellrollgeschwindigkeiten [$\mu\text{m/s}$] von CHO-E-Zellen auf folgenden Modellmembranen				
	POPC-Matrix	DSPC-Matrix	DSPC/POPC-Matrix (1% POPC)	DSPC/POPC-Matrix (5% POPC)	DSPC/POPC-Matrix (10% POPC)
10	0	0	0	0	0
5	0	0	0,12 ± 0,15	0,12 ± 0,16	0,12 ± 0,17
2	0	0,14 ± 0,24	0,13 ± 0,14	0,1 ± 0,13	0,1 ± 0,13
1	0	0,19 ± 0,21	0,14 ± 0,12	0,13 ± 0,11	0,13 ± 0,15
0,5	0	0,21 ± 0,18	0,16 ± 0,11	0,17 ± 0,09	0,17 ± 0,13
0,2	0,35 ± 0,26	0,48 ± 0,19	0,22 ± 0,12	0,24 ± 0,13	0,24 ± 0,16
0,1	0,44 ± 0,21	0,78 ± 0,2	0,3 ± 0,09	0,33 ± 0,08	0,33 ± 0,27
0,05	2,4 ± 0,77	4,9 ± 0,44	1,3 ± 0,21	1,4 ± 0,32	1,4 ± 0,52
0,02	5,7 ± 0,51	8,1 ± 1,13	9,7 ± 1,3	10,4 ± 1,28	10,4 ± 1,62
0,01	5,2 ± 1,37	15,4 ± 1,77	16,1 ± 2,8	16,2 ± 2,75	16,2 ± 3,14
0,005	5 ± 1,83			17,4 ± 3,12	
0,002	5,1 ± 2,74				

Tabelle 2 Rollgeschwindigkeiten in $\mu\text{m/s}$ der CHO-E-Zellen über unterschiedliche Modellmembranen in Abhängigkeit von der Glykolipidkonzentration.

Die Zahlenwerte ergeben sich aus mindestens 4 analogen Einzelbestimmungen und einer Anzahl von 100-400 registrierten Zellen pro Experiment. Ein Zellrollen wird demnach von sLe^x-Cer in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 0,05 % in einer DSPC- Matrix vermittelt.

Für entsprechende quantitative Aussagen wurde der Platzbedarf der verwendeten Lipide im Langmuir-Trog bei einem Lateraldruck von 38 mN/m bestimmt (entspricht Lateraldruck während der Filmübertragung). Bei einem Platzbedarf von 60 \AA^2 für sLex-Cer und 45 \AA^2 für DSPC ergeben sich entsprechend der Konzentrationen 0,1 bis 0,05% durchschnittliche Mengen von 300 bis 60 sLex-Cer Moleküle pro μm^2 Membranfläche. Vergleicht man diese Mengen Glykolipid mit den angenommenen 1000 Selektinmolekülen pro μm^2 CHO-E Zelloberfläche, so ergibt sich ein Ligand:Selektinverhältnis von 1:3 bis 1:17. Das macht deutlich, daß unabhängig von dem großen Selektinüberschuß der CHO-E Zellen der Rollprozeß ausschließlich durch eine Variation der Konzentration der Selektinliganden zu steuern ist. Diese Tatsache erhöht die Vergleichbarkeit der Experimente mit CHO-E Zellen zu natürlichen selektinexprimierenden Zellen, da die Selektinkonzentration in unserem System als fixe Größe betrachtet werden muß, das Zellrollen jedoch explizit durch die Liganden gesteuert werden kann. Allerdings stellt dieses Ungleichgewicht der Konzentration der Adhäsionsmoleküle nur einen theoretischen Mittelwert dar, der besonders bei einer Ligandenclustering in der Modellmembran nur noch wenig Aussagekraft besitzt. Werden die Liganden in kleinen Bereichen konzentriert, kann es zu einer Angleichung oder sogar einem Überschuß von Liganden gegenüber Selektinmolekülen kommen. Da die Zellen bei hohen Ligandenkonzentrationen nicht rollen sondern fest adhäreren, scheint eine lokale gegenüber einer generellen Konzentrierung der Liganden als eine Notwendigkeit für das Zellrollen.

Um zu beweisen, daß die Ursachen für diese Wechselwirkungen ausschließlich auf den Molekülkomplex Selektin-sLe^x-Ceramid zurückzuführen sind, wurden jeweils vier Kontrollversuche durchgeführt. Analoge Experimente, jedoch:

- 1) Verwendung von CHO Zellen (fehlendes Selektin)
- 2) vorherige Inkubation der CHO-E Zellen mit anti-E-Selektin IgG (blockiertes Selektin)
- 3) kein sLe^x-Cer in die Membran inkorporiert (fehlender Selektinligand)
- 4) Einbau eines Neuraminsäureceramids statt sLe^x-Cer in die Modellmembran (um elektrostatische Wechselwirkungen und das alleinige Vorhandensein einer Sialinsäure als Ursache für das Zellrollen auszuschließen).

In keinem dieser Kontrollexperimente konnte ein Zellrollen oder eine verstärkte Zelladhäsion an der Modellmembran beobachtet werden; in allen Versuchen adhärerten jedoch ca. 5% der Zellen mit allen Unterlagen, egal ob Glas, modifizierte oder unmodifizierte Modellmembran. Dieser Effekt war sowohl bei CHO als auch bei CHO-E Zellen zu beobachten. Da CHO eine konfluent auswachsende Zelllinie ist, könnte dieses Phänomen mit einem besonders schnellen Anwachsen einiger Zellen an der Unterlage innerhalb der Sedimentationszeit erklärt werden.

Als Schlußfolgerung aus den vorangegangenen Untersuchungen ergibt sich die Erkenntnis, daß gerichtet eingebaute synthetische sLe^x-Lipide in einer Modellmembran in der Lage sind, einen Zellrollprozeß selektinhaltiger Zellen in unserer Durchflußkammer zu vermitteln. Die Rollgeschwindigkeit beträgt dabei zwischen 8-15 µm/s, was einen unteren bis mittleren Wert im Vergleich zu *in-vivo* Beobachtungen darstellt.

Um das Zellrollen weiter zu optimieren, wurde die Größe der Ligandencluster in einem DSPC/POPC Gemisch wie oben beschrieben variiert. Durch die Zumischung von 1-20% POPC wurden die glykolipidreichen Areale gegenüber wenigen Nanometern der reinen DSPC-Matrix auf über 2 µm ausgedehnt. Um eine gute Vergleichbarkeit der Rollexperimente zu erreichen, wurden die gleichen Ligandenkonzentrationsschritte von 10-0,0001% verwendet. Bei POPC-Konzentrationen von 1-2,5% im DSPC konnte dabei jeweils eine leichte, allerdings nicht signifikante Erhöhung der Rollgeschwindigkeit beobachtet werden (nicht grafisch dargestellt). Bei einem 5%igen POPC-Anteil in der Matrix war die erhöhte Rollgeschwindigkeit am ausgeprägtesten. Zusätzlich ließ sich ein Zellrollen bei einer noch ligandenärmeren Membran nachweisen. Bei einem sLe^x-Cer-Molekülanteil von 0,002% in der Matrix vermittelte die Membran ein Zellrollen mit einer bis dahin nicht erreichten Geschwindigkeit von 18 µm/s. Bei einer weiteren Vergrößerung der Ligandencluster ging sowohl die Rollgeschwindigkeit als auch die Konzentrationstoleranz gegenüber den Liganden zurück. Bei einem POPC-Anteil von über 15% veränderte sich die Struktur der Membran derart, daß sich völlig ligandenfreie Bereiche mit riesigen POPC/Ligandeninseln von mehreren Millimetern abwechselten. Die Fähigkeit der Membranen für eine selektinspezifische Rollvermittlung glich bei diesen hohen POPC-Zumischungen den Beobachtungen unter Verwendung der reinen POPC-Membranen, die im folgenden Absatz ausgeführt sind.

Über die Notwendigkeit einer Ligandenclusterung kann allerdings erst durch den Vergleich der Experimente von geclusterten Membranen gegenüber homogen verteilten Modellmembranen aus Abbildung 23 geschlußfolgert werden. In analogen Experimenten wurde deshalb das Verhalten der CHO-E Zellen an den homogen verteilten POPC-Modellmembranen im Scherstrom untersucht. Bei Glykolipidkonzentrationen von 10 bis 0,1% kommt es ebenfalls zu einer festen Adhäsion der Zellen. Wird die Konzentration von 0,1% sLe^x-Cer unterschritten, lösen sich bei beginnendem Spülen die meisten Zellen von der Membran ab. Nur ein Anteil von ca. 5% der Zellen geht unterhalb der genannten Glykolipidkonzentration in eine langsame Bewegung mit ca. 5 µm/s über. Diese Bewegung wird von uns allerdings nicht als ein Zellrollen betrachtet, da abgesehen von der niedrigen Geschwindigkeit auch die sonst im Lichtmikroskop zu beobachtende charakteristische

Rotationsbewegung der Zellen während der Vorwärtsbewegung fehlt. Vielmehr werden die Zellen langsam über die fluide POPC-Membran geschoben. Dieser Effekt ist ebenfalls zu beobachten, wenn sich kein Glykolipid in der Membran befindet. Warum dieses „Schwimmen“ der Zellen nicht bei hohen Glykolipidkonzentrationen stattfindet, könnte mit den physikochemischen Eigenschaften der Lipide in Zusammenhang stehen. Die experimentell ermittelte homogene Verteilung des sLe^x-Cer im fluiden POPC kann mit der Fluidität des Glykolipids erklärt werden, welche durch das Tetrasaccharid als voluminöse Kopfgruppe verursacht wird. Der Lipidanker des Ceramids besitzt allerdings rigide Eigenschaften, da er unverzweigt, ohne Doppelbindungen und sehr langkettig ist. Diese rigiden Eigenschaften werden im idealen Mischungsverhalten mit POPC zwar durch die Kopfgruppen überdeckt, könnten aber durch Wechselwirkungen mit dem unteren, fixierten Monolayer einer durch Scherstreß verstärkten Lateraldiffusion der POPC-Moleküle entgegenwirken. Unspezifisch an der Modellmembran haftende Zellen könnten so bei Unterschreitung einer bestimmten Ligandenkonzentration mit den Membranlipiden lateral diffundieren.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse des Rollverhaltens in Abhängigkeit von Konzentration und lateraler Verteilung der Selektinliganden in einer Modellmembran in der folgenden Abbildung dargestellt [Abbildung 24].

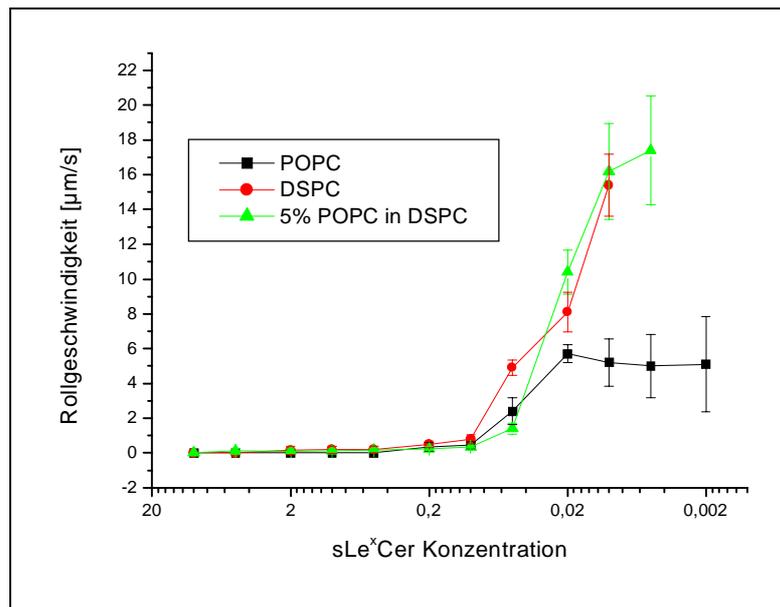


Abbildung 24 Grafische Darstellung der Zellrollgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von Glykolipidkonzentration und Ligandenstrukturierung in der Modellmembran. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur der Verlauf auf der effizientesten 5 % igen POPC Mischmatrix abgebildet.

Aus dieser grafischen Darstellung läßt sich die Abhängigkeit der Zellrollgeschwindigkeit gegenüber der Ligandenkonzentrationen auf den in Abbildung 23 dargestellten drei Modellmembranen miteinander vergleichen. Bei sehr hohen Ligandenkonzentrationen kommt es zu keinem Rollvorgang, und die Geschwindigkeit ist nahe 0. Wird diese Konzentration erniedrigt, beginnen die Zellen bis zu einer Minimalkonzentration zu rollen, danach sind keine Wechselwirkungen mehr zu beobachten.

An dieser Stelle läßt sich resümieren, daß eine Clusterbildung der Selektinliganden eine funktionelle Grundvoraussetzung des Zellrollens im Scherstrom ist. Ähnlich wie bei den natürlichen mucinartigen Strukturen mit einer Vielzahl von Bindungssepitopen am Proteingrundgerüst werden die einzelnen schwach affinen Bindungskräfte des sLe^x bei einer lokalen Konzentration potenziert. Erst dadurch sind sie in der Lage, auch relativ großen Zellen in einem Flüssigkeitsstrom den nötigen Widerstand in einem dynamischen Adhäsionsvorgang zu verleihen.

In unserer abstrakten Modellanordnung konnte anhand von Glykolipiden der Zellrollprozeß prinzipiell simuliert und dabei die Multivalenzhypothese untermauert werden. Eine quantitative Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das natürliche Leukozytenrollen ist

jedoch nur bedingt möglich. Besonders bemerkenswert ist dabei die relativ niedrige Rollgeschwindigkeit, die ihre Ursachen in der langsameren Bindungskinetik des E-Selektins und dem Fehlen von Mikrovillien hat. Zudem sollten die flexiblen, langgestreckten und weit aus der Membran herausragenden natürlichen Mucine zu einem noch wesentlich effizienteren Rollvorgang beitragen.

4.2.2. Einfluß des Schergrades

Die *in-vivo* beobachteten Zellrollgeschwindigkeiten halten sich trotz extremer Schergradunterschiede in den verschiedenen Organen und Geweben in relativ engen Grenzen. Wie bereits in Kapitel 2.4.2 beschrieben, wird für einen entsprechenden Regelmechanismus hauptsächlich die elastische Verformbarkeit der Zelle in Abhängigkeit des auf die Zelle wirkenden Schergrades verantwortlich gemacht. Um dieses Phänomen in unserer Durchflußkammer zu simulieren, führten wir Zellrollexperimente bei unterschiedlichem Scherstreß durch.

Als Standardversuchsbedingungen wählten wir eine DSPC-Lipidmatrix mit 0,025% sLe^x-Cer. Diese Membran hatte sich als besonders stabil hinsichtlich ihrer Herstellung und Übertragung herausgestellt. Im Gegensatz zu Membranen mit POPC-Anteilen bleibt ein DSPC-Layer bis zu einem Schergrad von 2000 s⁻¹ stabil. Ein Herausreißen von sLe^x-Cer Molekülen durch die Beanspruchung einer bindenden Zelle im Scherfluß konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden, da eine Vielzahl von Zellen nacheinander über die gleiche Membranfläche rollen kann, ohne daß sich dadurch die Rollcharakteristik ändert. Außerdem sind die Standardabweichungen der Zellrollgeschwindigkeit und der Anzahl der rollenden Zellen am günstigsten zu werten.

Die bisherigen Versuche wurden alle bei einem Schergrad von 200 s⁻¹ durchgeführt, was einem relativ niedrigen physiologischen Wert entspricht. In einer Reihe von Versuchen wurden die Zellen nach der üblichen Sedimentationszeit von 5 min einem ständig wachsenden Scherstrom ausgesetzt. Der Schergrad wurde dabei alle 10 Sekunden schrittweise erhöht und die Zellrollgeschwindigkeit ausgewertet [Abbildung 25].

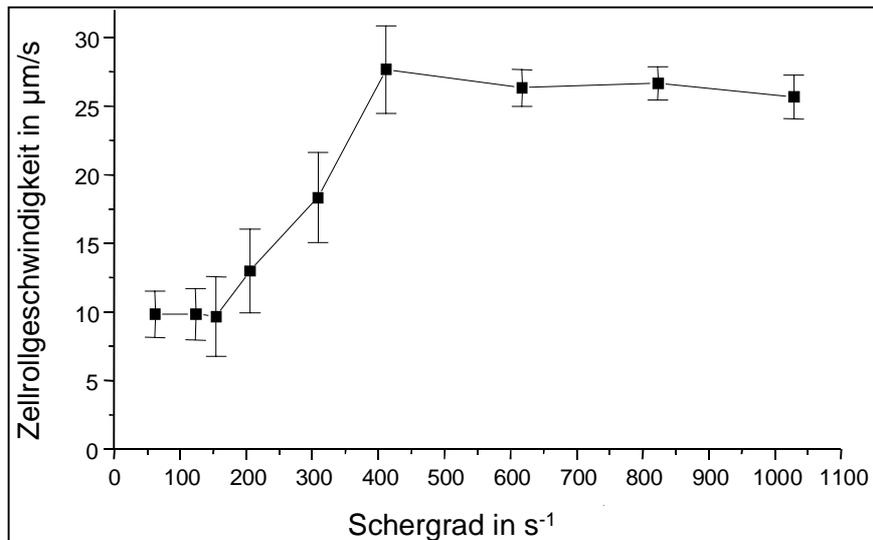


Abbildung 25 Abhängigkeit der Zellrollgeschwindigkeit vom Schergrad.

Bis zu einem Schergrad unterhalb $50 s^{-1}$ konnte kein Zellrollen beobachtet werden, die Zellen blieben unbeweglich auf der Modellmembran liegen. Wurde der Schergrad weiter erhöht, setzten sich die Zellen mit einer Geschwindigkeit von zunächst ca. $10 \mu m/s$ in Bewegung. Erst bei einem Schergrad von $170 s^{-1}$ stieg die Rollgeschwindigkeit weiter an, um bei ca. $400 s^{-1}$ ein Maximum zu erreichen und schließlich in ein Plateau überzugehen.

Obwohl die Verformung einer Zelle mit den vorhandenen mikroskopischen Mitteln leider nicht direkt dargestellt werden konnte, ist sie wahrscheinlich trotzdem die Ursache für dieses ausbalancierte Plateau. Unter stärkerem Scherstreß flachen die Zellen immer stärker ab, damit erhöht sich die Kontaktfläche zur Modellmembran, gleichzeitig verringert sich die Angriffsfläche für die strömende Flüssigkeit (siehe Kapitel 2.4.2).

Das ebenfalls dort beschriebene „threshold phenomenon“, wobei es unterhalb eines bestimmten Schergrades weder zu einer Zelladhäsion noch zu einem Rollen kommt, konnte in diesem Versuchsaufbau nicht beobachtet werden. Dieser Schutzmechanismus im Organismus verhindert ein zufälliges Einleiten der Adhäsionskaskade und ist wahrscheinlich dadurch begründet, daß ein Mindestmaß an Zellabflachung für ein Rollen vorhanden sein muß [102, 103]. Kommt es nach einzelnen Tetherereignissen durch mangelnden Scherstrom zu keiner nennenswerten Abflachung, wird der Rollvorgang nicht ausgelöst. Unter unseren experimentellen Bedingungen sind die Zellen jedoch nach ihrer Sedimentation infolge der Schwerkraft bereits zu einem gewissen Grad abgeflacht, was einen entsprechend hohen

Schergrad voraussetzt, um in ein Rollen überzugehen. Deshalb adhären die Zellen auf der Modellmembran unterhalb von 50 s^{-1} . Um das „threshold phenomenon“ in unserer Modellanordnung zu simulieren, müßte der Rollprozeß ohne eine Sedimentation der Zellen, direkt aus der strömenden Flüssigkeit heraus beobachtet werden. Derartige Adhäsionsereignisse sind allerdings im begrenzten mikroskopischen Blickfeld sehr selten und sind bei der Anzahl von 10^6 Zellen statistisch nicht auswertbar; es wäre ein Vielfaches an Zellmaterial notwendig.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das Zellrollen bei unterschiedlicher Scherbelastung in unserem Modellsystem (in Übereinstimmung mit früheren *in-vivo* und *in-vitro* Beobachtungen) simuliert werden konnte. Das auch von anderen Arbeitsgruppen gefundene Geschwindigkeitsplateau durch eine Abflachung der Zellen bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten konnte bestätigt werden.

4.2.3. Einfluß der Ligandenmolekülstruktur und -flexibilität

Eine Verstärkung der einzelnen Bindungskräfte durch eine lokale Konzentrierung von Glykolipiden konnte den natürlichen Selektinliganden nachempfunden werden. Die mucinartigen Strukturen zeichnen sich jedoch nicht nur durch eine räumliche Anhäufung einzelner Bindungs epitope aus, sie besitzen durch ihr langgestrecktes Peptidgerüst eine große Flexibilität. Durch das weite Herausreichen der Mucine aus einer Zellmembran sind sie zudem für adhärende Zellen sehr gut erkennbar. Um den Einfluß und die Bedeutung der Ligandenflexibilität auf das Rollverhalten der Zellen zu untersuchen, setzten wir Glykolipide mit unterschiedlich beweglichen Kopfgruppen ein. Die Flexibilität der Kopfgruppe wird dabei durch einen unterschiedlich langen Abstandshalter zwischen Tetrasaccharid und Lipidanker erreicht.

Die bisherigen Untersuchungen wurden mit sLe^x-Cer durchgeführt, dessen relative Unbeweglichkeit der Kopfgruppe durch einen vergleichsweise rigiden Laktosespacer verursacht wird. Durch den Ersatz der Laktose durch unterschiedlich lange Ethoxyeinheiten wird eine schrittweise veränderte Länge und Flexibilität der Glykolipide erreicht. In Zusammenarbeit mit der AG Schmidt, Universität Konstanz untersuchten wir die in folgender Abbildung dargestellten Glykolipide [Abbildung 26].

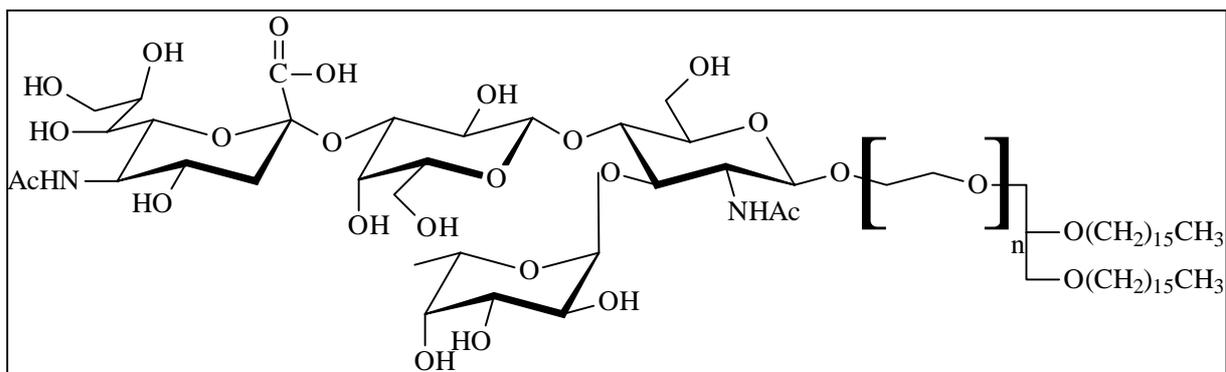


Abbildung 26 Glykolipidstrukturen mit $n=0$: sLe^x-L0, $n=3$: sLe^x-L3, $n=6$: sLe^x-L6, $n=9$: sLe^x-L9.

Die letzte Zahl im Namen der Verbindungen gibt jeweils die Anzahl der Ethoxyeinheiten zwischen sLe^x und einem Dialkylglycerol als Lipidanker an. Obwohl die Länge einzelner Ethoxyeinheiten bekannt ist, läßt sich die Gesamtlänge eines Ethoxyspacers in wäßriger Umgebung nicht errechnen, da der hydrophile Molekülteil nicht unbedingt langgestreckt vorliegt, sondern auch eine verknäulte Struktur annehmen kann. Der Einfluß der Spacerlänge wird demnach vordergründig nicht auf die lineare Ausdehnung sondern auf die Beweglichkeit der Moleküle zurückzuführen sein.

Die vier unterschiedlichen Strukturen wurden in Zellrollexperimenten untersucht und mit den Ergebnissen der sLe^x-Cer Versuche verglichen. Die Glykolipide wurden wiederum zu unterschiedlichen Konzentrationen mit DSPC in einem Monolayer gemischt, wobei fluoreszenzmikroskopisch bei 1-10% analoge Entmischungserscheinungen zum sLe^x-Cer zu beobachten waren. Das Zellrollverhalten wurde bei einem Schergrad von 200 s^{-1} analysiert und ist im nachstehenden Diagramm im Vergleich zu sLe^x-Cer zusammengefaßt [Abbildung 27].

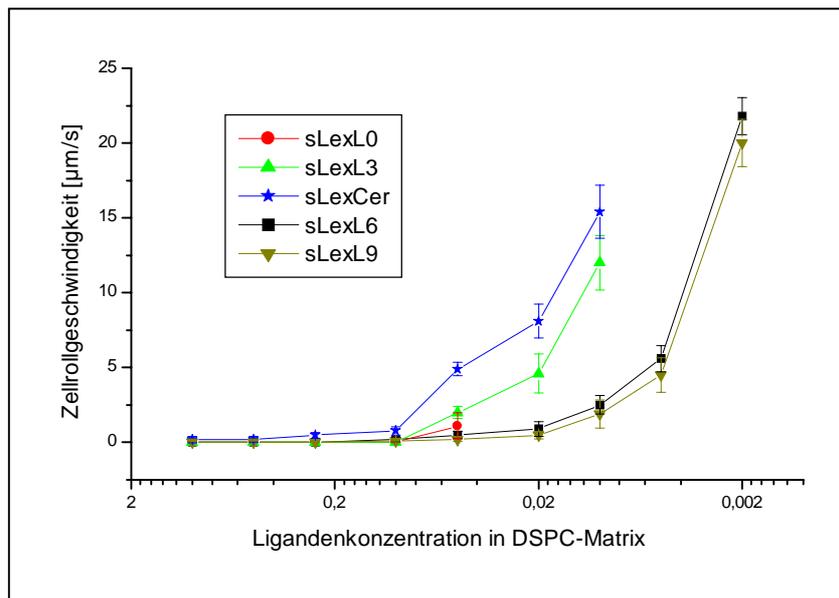


Abbildung 27 Abhängigkeit der Rollgeschwindigkeit von der Ligandenflexibilität.

Bei Glykolipidkonzentrationen von 1 bis 0,1% ist in jedem Falle nur eine feste Adhäsion zu verzeichnen. Reduziert man die Ligandenzumischung weiter, so sind die Glykolipide teilweise in der Lage, ein Zellrollen zu vermitteln. Im Falle des sLe^x-L0 reißen bei einer Konzentration von 0,05% fast alle Zellen ab, nur sehr wenige bewegen sich sehr langsam und kurzzeitig über die Modellmembran, bei weiterer Reduzierung bleibt jede Wechselwirkung aus. Das sLe^x-L0 wird zwar bei hohen Konzentrationen von den Zellen erkannt, was zur festen Adhäsion führt, durch das Fehlen eines Spacers und die daraus resultierende Starre ist dieses Molekül nicht zur Vermittlung eines Zellrollens befähigt. Daraus geht hervor, daß ein Mindestmaß an Flexibilität der Selektinliganden für ein Zellrollen notwendig ist.

Die Resultate des sLe^x-L3 zeigen große Nähe zu den sLe^x-Cer Werten. Der Abstand der Kopfgruppe von der Membranoberfläche ist bei beiden Molekülen sehr ähnlich, da die Länge eines Laktosemoleküls mit drei Ethoxyeinheiten vergleichbar und ein Abknicken noch nicht zu erwarten ist. Das langsamere Rollen bei gleichen Konzentrationen ist demnach offensichtlich auf die größere Bindungseffizienz des flexibleren sLe^x-L3 zurückzuführen.

Noch geringere Unterschiede im Rollverhalten sind bei der Gegenüberstellung von sLe^x-L6 und sLe^x-L9 zu finden. Im Vergleich zu sLe^x-L3 sind diese längsten Liganden noch effizienter, was nicht nur in einer niedrigeren Rollgeschwindigkeit bei gleicher Konzentration

zum Ausdruck kommt. Zusätzlich sind sie in der Lage, das Zellrollen bis zu einer Konzentration von 0,0025% zu vermitteln. Da man bei einer rollenden Zelle eine Kontaktfläche von ca. 10% des Zelldurchmessers annimmt, steht die Zelle bei diesen niedrigen Konzentrationen rein rechnerisch nur noch mit ca. 50 Glykolipidmolekülen in Kontakt.

Die Ergebnisse dieser Versuche lassen die Schlußfolgerung zu, daß eine Vergrößerung der Ligandenflexibilität eine Erhöhung der Bindungseffizienz zur Folge hat. Das äußert sich in niedrigeren Rollgeschwindigkeiten und niedrigeren minimalen Ligandenkonzentrationen. Der Konzentrationsbereich, in dem ein Zellrollen stattfindet, bleibt jedoch mit ca. dem zehnfachen der Minimalkonzentration unbeeinflusst. Eine weitere Verlängerung der Spacer über neun Ethoxyeinheiten läßt keine weitere Effizienzerhöhung erwarten, da bereits bei sLe^x-L6 ein Optimum erreicht zu sein scheint. Analog zur großen Beweglichkeit der langgestreckten natürlichen Selektinliganden beeinflusst eine hohe Flexibilität der Glykolipide das Rollverhalten positiv. Damit ist eine funktionelle Annäherung langgestreckter Glykolipide an die Eigenschaften der Mucine gegeben. Diese Ergebnisse wurden 1998 zusammengefaßt und veröffentlicht [142].

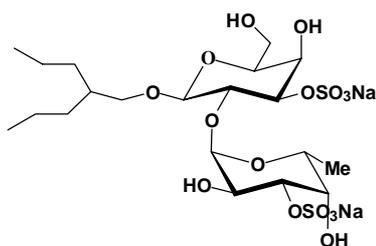
4.3. Inhibierung des Zellrollens

Das selektininduzierte Zellrollen stellt den initialen Schritt in der Adhäsionskaskade der Leukozyten sowohl bei akuten als auch chronischen Entzündungserscheinungen dar. Eine Blockierung der Selektinbindungen unterbricht die gesamte Kaskade und verhindert letztendlich die Leukozytenmigration in das Gewebe. Aus diesem Grund stellt die Inhibierung von Selektinen einen neuartigen pharmakologischen Ansatzpunkt für eine antiinflammatorische Therapie dar. Seit Bekanntwerden dieser Bedeutung der Selektine wird von einer Vielzahl von Arbeitsgruppen ausgehend vom sLe^x als Standardligand nach potentiellen Selektininhibitoren gesucht.

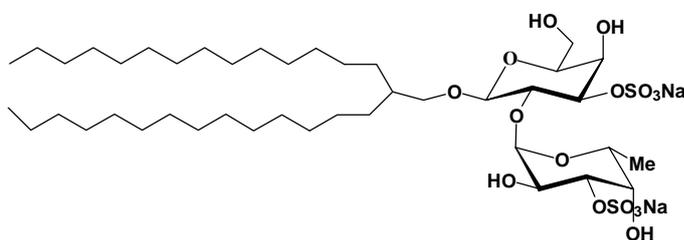
Diese Substanzen sind meist glykosidischer Struktur und wurden in statischen Zellbindungsassays auf ihre Wirksamkeit hin untersucht. Aufgrund der Sonderstellung der Selektinbindung hinsichtlich ihrer Bindungskinetik und dem daraus resultierenden Adhäsionsverhalten der Zellen in einer Rollbewegung sollte die Untersuchung der Selektininhibitoren in einem dynamischen Assay jedoch aussagekräftiger sein als unter statischen Bedingungen.

Aufbauend auf unseren bisherigen Untersuchungen zum selektinabhängigen Zellrollen untersuchten wir potentielle antiinflammatorische Substanzen auf ihre selektininhibitorische Effizienz unter dynamischen Bedingungen. Die japanische Arbeitsgruppe um Ikami stellte uns

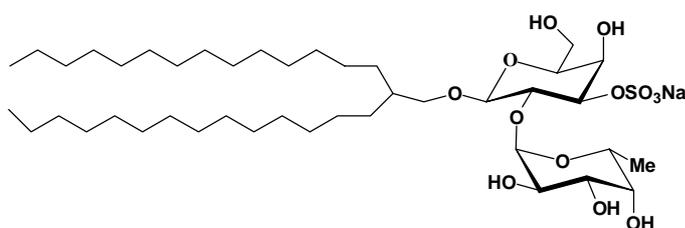
eine große Anzahl potentieller Inhibitoren für eine Untersuchung unter dynamischen Bedingungen zur Verfügung. Diese Verbindungen sind ausgehend vom sLe^x stark strukturvereinfacht. Es handelt sich dabei um sulfatierte und phosphorylierte Laktose-, Galaktose- und Fucose-Galaktose-Derivate mit zusätzlichen unterschiedlich stark lipophilen Molekülanteilen [143, 144, 145] [Abbildung 28].



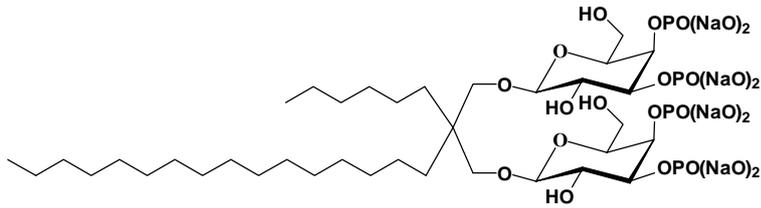
1. Dinatrium [2-(Propyl)pentyl-O-(α -L-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopyranosyl)-3O,3O'-disulfonat]



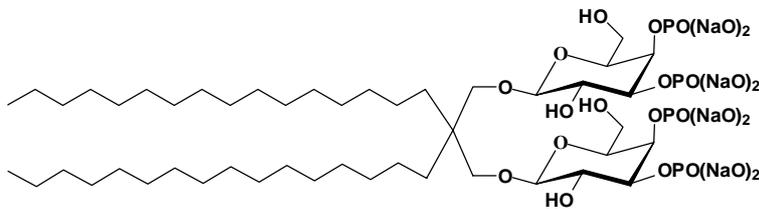
2. Dinatrium [2-(Tetradecyl)hexadecyl-O-(α -L-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopyranosyl)-3O,3O'-disulfonat]



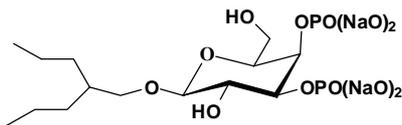
3. Natrium [2-(Tetradecyl)hexadecyl-O-(α -L-Fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopyranosyl)-3O-sulfonat]



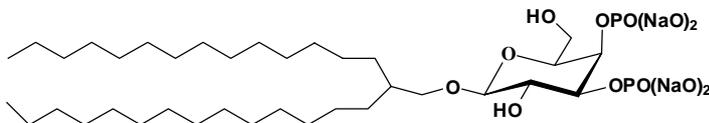
4. Octanatrium [2-Hexadecyl-2-hexyl-propan-1,3-O,O'-bis-(β-D-galaktopyranosyl)-3O,4O,3'O,4'O-tetraphosphonat]



5. Octanatrium [2,2-Dihexadecyl-propan-1,3-O,O'-bis-(β-D-galaktopyranosyl)-3O,4O,3'O,4'O-tetraphosphonat]



6. Tetranatrium [2-(Propyl)pentyl-β-D-galaktopyranosyl-3O,4O-diphosphonat]



7. Tetranatrium [2-(Tetradecyl)hexadecyl-β-D-galaktopyranosyl-3O,4O-diphosphonat]

Abbildung 28 Strukturen der potentiell antiinflammatorischen Verbindungen.

Grundsätzlich wurde versucht, durch Modifikationen am Ligandenmolekül zu synthetisch leicht zugänglichen Verbindungen zu gelangen, die die Bindungsaffinität von sLe^x

zu Selektinen übertreffen. Nachdem entdeckt wurde, daß ein Desoxyderivat des sLe^x eine wesentlich höhere Bindungsaffinität besitzt [146], wurden von Ikami et al. verschiedene hydrophobe Reste zur Bindungsverstärkung eingebaut. Zusätzlich sollten negative Ladungen oder bestimmte Sulfatierungsmuster den Substanzen positive Effekte auf eine inhibitorische Potenz verleihen.

In einem statischen Bindungsassay wurden diese Verbindungen auf ihre blockierende Wirkung bei der Bindung von HL-60 Zellen auf immobilisiertem Selektin-IgG-Fusionsprotein untersucht [Tabelle 3].

Substanz	Triviale Beschreibung	% Hemmung des P-Selektins	% Hemmung des L-Selektins	% Hemmung des E-Selektins
sLe ^x	Standard	3±6	0±5	0±4
1	kurzkett.disulfat. Fukose-Galaktose	16	33	2
2	langkett.disulfat. Fukose-Galaktose	76	69	8
3	langk.monosulf. Fukose-Galaktose	100	100	0
4	gemischkett. dimere diphosph.Galaktose	0	0	5
5	langkett.dimere diphosph. Galaktose	0	0	11
6	kurzkett.diphos. Galaktose	13	0	20
7	langkett.diphos. Galaktose	24	0	20

Tabelle 3 Inhibierungswerte der verwendeten Glykolipide im statischen Bindungsassay nach Ikami.

Diese Hemmwerte wurden bei einer Konzentration von 0,3 mM mit dem Standard sLe^x verglichen. Die Anzahl und Art der Ladungen zeigen keinen Zusammenhang, hingegen besitzen die langkettigen Derivate eine deutliche Bindungsverbesserung.

Um diese Substanzen in unserer Durchflußkammer untersuchen zu können, mußte der Versuchsaufbau verändert werden, da durch die oberflächenaktiven Eigenschaften der Inhibitoren der Monolayer vom Glasträger abgelöst wurde. Im Vordergrund stand also eine vollständige Umgestaltung der Modellmembran, in dem jetzt aus Blutplättchen isoliertes P-Selektin [147] kovalent an den Glasträger gebunden wurde. Dazu wurde über das trivalente Cyanurchlorid als Kopplungsreagens das Protein in einer Self-Assembling-Technik zu einer homogenen Membran fixiert [Abbildung 29].

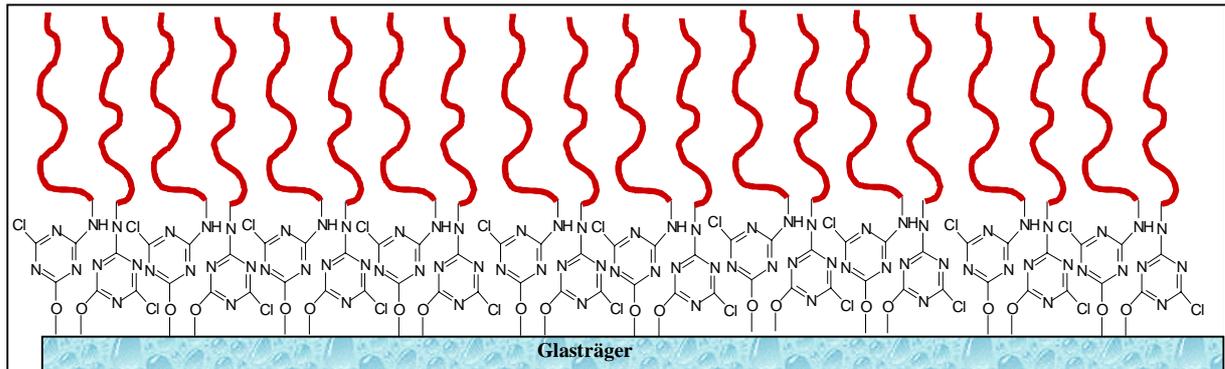


Abbildung 29 Nach Self-Assembling über Cyanurchlorid kovalent fixiertes P-Selektin (rot).

Cyanurchlorid reagiert in einem ersten Arbeitsgang mit den OH-Gruppen der Glasoberfläche. Nach Entfernen des überschüssigen Kopplungsreagens erfolgte die Umsetzung einer Aminogruppe des Selektins mit der zweiten Valenz des bereits fixierten Cyanurchlorid bei pH=8,8. Als Blindprobe dienten mit Albumin gekoppelte Träger.

Als Rollzellen wurden die ebenfalls von Ikami benutzten PSGL-1-tragenden HL-60 Zellen benutzt. Durch Interaktionen von P-Selektin mit seinem natürlichen Liganden PSGL-1 ist dieser Versuchsaufbau nicht mehr so abstrakt wie unter Verwendung der sLe^x-Glykolipide.

Auf den P-Selektin-beschichteten Oberflächen kommt es im Scherstrom zu einer festen Adhäsion der HL-60 Zellen. Durch schrittweises Zumischen von Albumin zum P-Selektin vor der Kopplungsreaktion konnte schließlich eine Schicht mit 50% Selektin erhalten werden, über die die PSGL-1-tragenden HL-60 Zellen rollen.

Vor den Rollexperimenten wurden 10^5 Zellen zusammen mit 30 nmol der jeweiligen Inhibitorsubstanz gemischt und mit einer speziellen Einspritztechnik direkt und unverdünnt in die Durchflußkammer injiziert. Auf der Glasplatte befand sich ca. 0,1 nmol Selektin, daraus ergibt sich ein ca. 300facher Überschuß des Inhibitors. Während der folgenden Inkubation steht den Inhibitormolekülen und den PSGL-1-Oberflächenstrukturen die gleiche Zeit von 2 min zur Verfügung, in der sie um die immobilisierten Selektinmoleküle auf dem Glasträger konkurrieren. Beim folgenden Strömungsprozeß mit einem Schergrad von 200 s^{-1} wurde in Analogie zu den Rollexperimenten die Anzahl der adhärierenden Zellen und die Zellrollgeschwindigkeit ausgewertet und gegenübergestellt [Abbildung 30].

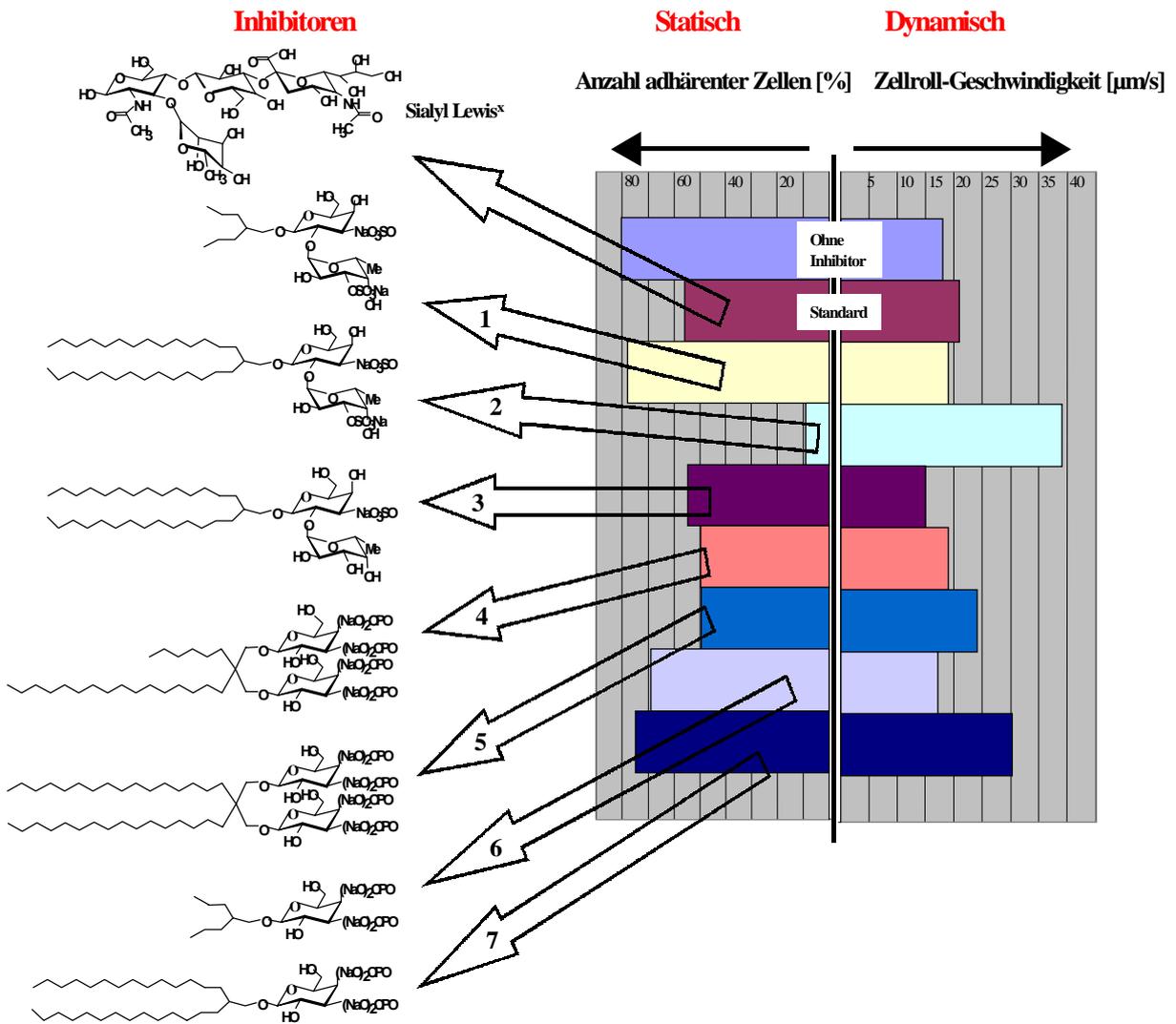


Abbildung 30 Einfluß selektininhibitorischer Substanzen auf das statische und dynamische Bindungsverhalten von HL-60 Zellen an einer P-Selektinmembran.

In dieser Darstellung sind inhibitorische Effekte auf das statische und dynamische Bindungsverhalten der HL-60 Zellen gegenübergestellt. Als Standardinhibitor wurde lösliches sLe^x verwendet.

Der prozentuale Anteil der adhärenierten Zellen auf der Selektinschicht ist auf der linken Hälfte des Diagramms abgebildet. Ist eine geringere Anzahl adhärenierender Zellen festgestellt, so wird von einer höheren inhibitorischen Potenz der gelösten Substanz ausgegangen. Diese Werte sind einem statischen Assay zuzuordnen und sollten mit den Untersuchungen von Ikami vergleichbar sein. Die Abweichungen der Ergebnisse, besonders bei Substanz 2, ist offensichtlich auf die für Selektinbindungen funktionellen Versuchsbedingungen in der Durchflußkammer zurückzuführen. Durch die physiologischen Flußbedingungen in der Modellapparatur wirkt sich ein inhibitorischer Effekt der sLe^x -Analoga während des Zellrollvorganges auf die dynamischen Selektinbindungen aus. Im klassischen Zellbindungsassay werden die Zellen jedoch unter statischen Bedingungen mit einem Substrat inkubiert und danach mit einem unphysiologischen Schergrad abgespült. Die unterschiedlichen Ergebnisse bei diesen Modellanordnungen verdeutlichen die Bedeutung der natürlichen Fließbedingungen des Blutes bei der Untersuchung von Selektinwechselwirkungen. Da die löslichen Substanzen unter Flußbedingungen auch gewissen Scherkräften ausgesetzt sind, unterscheidet sich offensichtlich deren dynamisches Bindungsverhalten ebenfalls von der Kinetik und Affinität in einem statischen Versuchsaufbau. Das erklärt die Unterschiede zu Ikamis Untersuchungen und unterstreicht den Vorteil einer Durchflußkammer.

Betrachtet man neben den fest adhärenierten Zellen zusätzlich den Einfluß der sLe^x -Konkurrenten auf den Zellrollvorgang, so sollten sich die inhibitorischen Effizienzen noch deutlicher differenzieren lassen. Deshalb sind auf der rechten Seite der Darstellung den statischen Werten die Zellrollgeschwindigkeiten zugeordnet. Eine höhere Bindungsaffinität des Inhibitors zum Selektin sollte sich hierbei in einer erhöhten Rollgeschwindigkeit wiederfinden. Bei den meisten Substanzen sind innerhalb der Experimente Übereinstimmungen zu finden. Den stärksten inhibitorischen Effekt gegenüber sLe^x zeigt Substanz 2 unter beiden Auswertungsvarianten. Das Rollverhalten wird von dieser Substanz derart moduliert, daß die Zellen eine außerordentlich hohe Geschwindigkeit von ca. $40 \mu\text{m/s}$ erreichen. Das läßt darauf schließen, daß im Gegensatz zu Substanz 1 der langkettige Molekülteil zu einer wesentlichen Affinitätssteigerung zum P-Selektin führt.

Aber auch die höhere Anzahl der Sulfatgruppen der Substanz 2 hat einen bindungsverstärkenden Einfluß im Vergleich zu Substanz 3. Dieser läßt sich damit erklären, daß Selektinbindungen hauptsächlich über Wasserstoffbrücken an Kohlenhydratstrukturen stattfinden, die zwar von einer schnellen Kinetik, aber auch von einer sehr kurzen Reichweite und ständiger Konkurrenz zu Wassermolekülen geprägt sind. Erhöht sich der weitreichende elektrostatische Bindungsanteil bei der Ausbildung eines Bindungskomplexes unter

dynamischen Bedingungen, sollte sich dies positiv auf die inhibitorische Effizienz der Substanzen, besonders im Rollverhalten der Zellen äußern. Dieser Effekt muß nicht zwangsweise in einer höheren Affinität des Liganden resultieren und im statischen Assay wiedergefunden werden.

Zwischen den Effizienzen der Substanzen 4 und 5 ist durch alleiniges Auszählen der haftenden Zellen keine Differenzierung möglich. Erst beim Betrachten der Rollgeschwindigkeit wird die größere inhibitorische Potenz von Substanz 5 deutlich. Dies kann wiederum auf den größeren lipophilen Molekülteil zurückgeführt werden.

Lediglich die Rollgeschwindigkeit der Substanz 7 zeigt keine Korrelation zur Anzahl der adhärenierten Zellen. Die Betrachtung der Rollgeschwindigkeiten als Maß inhibitorischer Potenz scheint allerdings durch die größere Lipophilie gegenüber Substanz 6 realistischer.

Diese Ergebnisse beweisen einheitlich, daß sich ein hydrophober Substituent am Inhibitormolekül positiv auf seine inhibitorische Potenz auswirkt. 1997 konnten mittels Molecular Modeling zwei hydrophobe Bereiche an der Lektindomäne des E-Selektins nachgewiesen werden, die bei der Existenz von lipophilen Resten an den Liganden bindungsverstärkend wirken können [148].

Die Auswertung dieser Versuche macht die generelle Eignung unseres Modellsystems für die Suche nach potentiellen Selektininhibitoren deutlich. Trotz des großen Aufwandes der einzelnen Versuche stehen aber zwei Möglichkeiten der Auswertung zur Verfügung. Das läßt eine noch feinere Differenzierung der inhibitorischen Effekte zu. Zudem werden in der Durchflußkammer die physiologischen Bedingungen simuliert, unter denen die Selektine natürlicherweise agieren. Die Betrachtungen der dynamischen Werte sollte daher zuverlässiger und aussagekräftiger sein.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Etablierung eines Modellsystems für die Untersuchung selektinvermittelter Adhäsionsereignisse und deren molekulare Bindungseigenschaften vorgestellt. Darauf aufbauend wird die pharmazeutische Relevanz der Selektine untersucht und die Modellanordnung für die Suche nach neuartigen potentiell antiinflammatorischen Substanzen genutzt.

Aufgrund ihrer initialen Stellung in der Leukozyten-Adhäsionskaskade nehmen die Selektine eine Schlüsselrolle im Entzündungsgeschehen ein. Gemeinsam mit ihren Liganden sind nur die Selektine in der Lage, Leukozyten aus dem Blutstrom heraus über eine rollende Bewegung der Zellen abzubremsen. Dieses Zellrollen stellt eine Sonderform der Zelladhäsion dar und wurde in einer Durchflußapparatur modellhaft simuliert.

Adhäsionsuntersuchungen mit verschiedenen Zellmodellen bestätigten, daß eine Scherkraft-induzierte Zellrollbewegung an die Bindungseigenschaften und die Bindungskinetik der Selektine gebunden ist und nicht durch andere Lektin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen simuliert werden kann. Zur Aufklärung der molekularen Bindungseigenschaften der Selektine im Zellrollprozeß wurden unterschiedliche Glykolipidliganden in Modellmembranen inkorporiert und deren Bindungseigenschaften untersucht.

Im Gegensatz zu den natürlichen Selektinliganden, die komplexe Glykoproteinstrukturen darstellen, kamen in der Arbeit definierte Glykolipide zum Einsatz, mit denen die Zusammenhänge von Selektinbindung und Zellrollen deutlich hervorgehoben werden konnten.

Die Konstruktion und Weiterentwicklung der Durchflußapparatur in Kombination mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie resultierte in einem geeigneten System, um ein Zellrollen in Glykolipid-dotierten Modellmembranen unter Flußbedingungen zu simulieren und auszuwerten. Mit den Ergebnissen konnten grundlegende Voraussetzungen für ein Zellrollen aufgezeigt werden.

- Neben den natürlichen Glykoproteinen sind auch Glykolipide mit den entsprechenden saccharidischen Bindungsepitopen in der Lage, Zellen in einem Scherstrom in eine Rollbewegung übergehen zu lassen.
- Die Abhängigkeit von lateraler Strukturierung der Glykolipide beweist, daß eine Beteiligung vieler schwach affiner Einzelbindungen zu den Selektinen im Rollprozeß notwendig ist. Unter Verwendung entsprechender Matrixlipide der Modellmembran wurde eine Clusterung der Selektinliganden erreicht. Eine räumliche

Konzentrierung der Bindungsepitope ist daher offensichtlich das gesuchte Prinzip der natürlichen Liganden.

- Daß sich die hohe Flexibilität der natürlichen Liganden ebenfalls positiv auf den Rollprozeß auswirkt, konnte mit dem Einsatz unterschiedlich langer Glykolipide nachgewiesen werden.
- Die Beobachtung des Zellrollprozesses unter unterschiedlichen Scherbedingungen zeigt, daß eine gewisse reversible Verformbarkeit der Zellen für das Rollen und dessen Regulation eine Grundvoraussetzung ist.

Die Modellanordnung wurde ebenfalls für die Suche nach Inhibitoren genutzt, die unter dynamischen Bedingungen das Rollverhalten der Zellen modulieren. Daraus läßt sich exakt auf die inhibitorische Effizienz verschiedener Substanzen als potentielle antiinflammatorische Substanzen schließen. Dabei läßt sich die inhibitorische Wirksamkeit der Verbindungen empfindlicher und realistischer differenzieren als in einem statischen Zellbindungsassay.

Auf der Suche nach potentiellen Selektinmimetika bleibt die Frage offen, ob das Clusterprinzip für eine enorme Affinitätserhöhung bei gleichbleibender schneller Bindungskinetik mittels löslicher Strukturen verwirklicht werden kann. Die Clusterung von Selektinliganden an den Oberflächen arzneitragender Vehikel und deren gezielter Transport zum Entzündungsherd scheint dagegen sehr aussichtsreich.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Adhäsionskaskade der Leukozyten im Blutgefäß nach einer entzündlichen Stimulierung.	3
Abbildung 2	Schematische Darstellung der Selektinmoleküle.	6
Abbildung 3	Schematische Darstellung von Struktur und Lokalisation der Selektine und ihrer entsprechenden Liganden.	11
Abbildung 4	Struktur des Sialyl Lewis ^x : Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc.	13
Abbildung 5	Geschwindigkeitsprofil des Blutes in einer Kapillare; schematisch. Übergang vom gesunden zum entzündeten Abschnitt.	18
Abbildung 6	Schematische Darstellung der Bildung einer organisierten Monoschicht an einer hydrophilen Oberfläche durch molekulare Adsorption aus organischer Lösung.	30
Abbildung 7	Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer CHO-E Zelle (unten links) und der vergrößerte Ausschnitt der Zelloberfläche. Die Zelle wurde mit Immunogold-markierten Antikörpern behandelt, die als dunkle Punkte an der Zellmembran zu erkennen sind.	36
Abbildung 8	Schematische Darstellung der Durchflußapparatur.	38
Abbildung 9	Schema der Adhäsionsereignisse selektinexprimierender CHO-E-Zellen und der Modellmembran in der Flußkammer.	39
Abbildung 10	Schematische Darstellung eines hydrophobisierten Glasträgers mit Hexadecylsilan.	40
Abbildung 11	Schema der Vesikelfusionstechnik durch das spontane Aufspreiten von Liposomen auf einem Glasträger.	41
Abbildung 12	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines durch Vesikelfusion beschichteten Glasträgers.	42
Abbildung 13	A: Druck/Flächen Diagramm von DMPE bei 20°C als Beispiel für das Durchlaufen mehrerer Phasenzustände: Darstellung des Kompressionsverhaltens und Bezeichnung der Phasenzustände Π_K =Kollapsdruck, A_K =Kollapsfläche.	44

<i>Abbildung 14 Schema der Langmuir-Blodgett-Technik. Im Teil A werden die rot dargestellten Glykolipide mittels einer Barriere in der Lipidmatrix vororganisiert. Dieser Film wird in Teil B auf einen hydrophoben Glasträger übertragen.</i>	45
<i>Abbildung 15 Fluoreszenzmikroskopisches Bild einer Modellmembran. In der Mitte befindet sich das ausgebleichene Quadrat. Das Bild hat eine Diagonale von 400 μm.</i>	46
<i>Abbildung 16 Zeitlicher Verlauf der Wiederherstellung der Fluoreszenz durch Lateraldiffusion nach Ausbleichen eines Quadrates in der Mitte. Die Bilder wurden im Abstand von 60 Minuten aufgenommen und in einer topografischen Darstellung abgebildet.</i>	46
<i>Abbildung 17 Strahlengang in einem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. 1: Laserquelle; 2: Probe; 3: Objektiv; 4: dichroischer Strahlenteiler; 5: Lochblende (Pinhole); 6: Photomultiplier.</i>	48
<i>Abbildung 18 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Monolayers mit 10% eines Mannosids: Bild A auf Wasser/Luft Grenzfläche (Fluoreszenzmarkierung mittels NBD-PE) und in Bild B nach der Übertragung auf Glas (nach Inkubation mit FITC-markiertem ConA).</i>	50
<i>Abbildung 19 Fluoreszenzmikroskopisches Bild des Zellrollvorganges. Alle mit der Zellmembran in Wechselwirkung stehende Zellen erscheinen als helle Flächen. Die frei im Medium fließenden Zellen erscheinen als helle Streifen. Die Bilddiagonale beträgt 900 μm.</i>	54
<i>Abbildung 20 Überlagerung von drei zeitlich aufeinanderfolgenden Falschfarbenbildern während eines Zellrollexperimentes.</i>	55
<i>Abbildung 21 Sialyl Lewis^X-Lipid mit Laktospacer und Ceramidanker; [(2S,3R,4E)-2-amino-3-hydroxy-2(N-palmitoyl)-octadec-4-en-1-yl]-D (Kalium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-α-D-galakto-2-nonulopyranosylat)-(2\rightarrow3)-(β-D-galaktopyranosyl)-(1\rightarrow4)-[α-L-fucopyranosyl)-(1\rightarrow3)]-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow3)-(β-D-galaktopyranosyl)-(1\rightarrow4)-β-D-glucopyranosid.</i>	57
<i>Abbildung 22 AFM-Aufnahme eines DSPC Modellmembran mit 1% sLe^x-Cer. Die Glykolipidcluster sind als helle Erhebungen erkennbar.</i>	59

<i>Abbildung 23</i>	<i>Oben: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Verteilung von 1% Glykolipid in der Modellmembran mit dem Matrixlipid DSPC (links) und DSPC/POPC 95:5 (rechts).....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 24</i>	<i>Grafische Darstellung der Zellrollgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von Glykolipidkonzentration und Ligandenstrukturierung in der Modellmembran. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur der Verlauf auf der effizientesten 5 % igen POPC Mischmatrix abgebildet.</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 25</i>	<i>Abhängigkeit der Zellrollgeschwindigkeit vom Schergrad.</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 26</i>	<i>Glykolipidstrukturen mit n=0: sLe^x-L0, n=3: sLe^x-L3, n=6: sLe^x-L6, n=9: sLe^x-L9.....</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 27</i>	<i>Abhängigkeit der Rollgeschwindigkeit von der Ligandenflexibilität.....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 28</i>	<i>Strukturen der potentiell antiinflammatorischen Verbindungen.</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 29</i>	<i>Nach Self-Assembling über Cyanurchlorid kovalent fixiertes P-Selektin (rot).</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 30</i>	<i>Einfluß selektininhibitorischer Substanzen auf das statische und dynamische Bindungsverhalten von HL-60 Zellen an einer P-Selektinmembran.</i>	<i>76</i>

7. Literaturverzeichnis

- 1 Springer T.A., Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.*: 57 (1995) 827-872.
- 2 Butcher E.C., Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*: 67 (1991) 1033-1036.
- 3 Lorant D.E., Patel K.D., McIntyre T.M., McEver R.P., Prescott S.M., Zimmerman G.A., Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombine: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J. Cell. Biol.*: 115(1) (1991) 223-224.
- 4 Zimmerman G.A., Prescott S.M., McIntyre T.M., Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol-Today*: 13(3) (1992) 93-100.
- 5 Wagner R., Erläuterungstafeln zur Physiologie und Entwicklungsgeschichte. *Leopold Voss*: Leipzig. (1839).
- 6 Virchow R., Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. *August Hirschwald Verlag*: Berlin (1871).
- 7 Cohnheim J., Lecture on general pathology: A handbook for practioners and students. *The New Sydenham Society*: London (1889).
- 8 Barondes S.H., Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends Biochem. Sci.*: 13 (1988) 480-482.
- 9 Drickamer K., Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.*: 263 (1988) 9557-9560.
- 10 Huang K.S., Graves B.J., Wolitzky B.A., Functional Analysis of Selectin Structure, edited by Vestweber. *Amsterdam: Harwood*: 3 (1997) 1-29.
- 11 Gallatin W.M., Weissmann I.L., Butcher E.C., A cell surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*: 304 (1983) 30-34.
- 12 Stoolman L.M., Rosen S.D., Possible role for cell surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation. *Cell Biol.*: 96 (1983) 722-729.
- 13 Yednock T.A., Stoolman L.M., Rosen S.D., Phosphomannosyl-derivatized beads detect a receptor involved in lymphocyte homing. *Cell Biol.*: 104 (1987) 713-714.
- 14 Lewinsohn D.M., Bargatze R.F., Butcher E.C., Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes and other leukocytes. *J. Immunol.*: 138 (1987) 4313-4321.
- 15 Hafezi-Moghadam A., Ley K., Relevance of L-Selectin shedding for leukocyte rolling *in-vivo*. *J. Exp. Med.*: 198 (1999) 939-947.
- 16 Steward M., Thiel M., Hagg N., Leukocyte Integrins. *Cell Biol.*: 7 (1995) 690-696.
- 17 Kishimoto T.K., Jutila M.A., Berg E.L., Butcher E.C., Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science*: 245 (1989) 1238-1241.
- 18 Ley K., Gaehtgens P., Fennie C., Singer M.S., Lasky L.A., Rosen S.D., Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules *in-vivo*. *Blood*: 77 (1991) 2553-2555.
- 19 von Andrian U.H., Chambers J.D., McEvoy L.M., Bargatze R.F., Arfors K.E., Butcher

-
- E.C., Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte β_2 integrins *in-vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**: 88 (1991) 7538-7542.
- 20 Jutila M.A., Bargatze R.F., Kurk S., Warnock R.A., Ehsani N., Watson S.R., Walcheck B., Cell surface P- and E-selectin support shear-dependent of bovine γ/δ T cells. **J. Immunol.**: 153 (1994) 3917-3928.
- 21 Diacovo T.G., Roth S.J., Morita C.T., Rosat J.P., Brenner M.B., Springer T.A., Interactions of human alpha/beta and gamma/delta T lymphocyte subsets in shear flow with E-selectin and P-selectin. **J. Exp. Med.**: 183 (1996) 1193-1203.
- 22 McEver R.P., Martin M.N., A monoclonal antibody to a Membrane glycoprotein binds only to activated platelets. **J. Biol. Chem.**: 259 (1984) 9799-9804.
- 23 Hsu-Lin S., Bermann C.L., Furie B.C., August D., Furie B., A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. **J. Biol. Chem.**: 259 (1984) 9121-9126.
- 24 Hamburger S.A., McEver M.P., GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. **Blood**: 75 (1990) 550-554.
- 25 Larsen E., Celi A., Gilbert G.E., Furie B.C., Erban J.K., Bonfanti R., Wagner D.D., Furie B., PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. **Cell**: 59 (1989) 305-312.
- 26 Geng J.G., Bevilacqua M.P., Moore K.L., McIntyre T.M., Prescott S.M., Kim J.M., Bliss G.A., Zimmermann G.A., McEver R.P., Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. **Nature**: 343 (1990) 757-760.
- 27 Hattori R., Hamilton K.K., Fugate R.D., McEver R.P., Sims P.J., Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. **J. Biol. Chem.**: 264 (1989) 7768-7771.
- 28 Subramaniam M., Koedam J.A., Wagner D.D., Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. **Mol. Biol. Cell**: 4 (1993) 791-801.
- 29 Bevilacqua M.P., Pober J.S., Mendrick D.L., Cotran R.S., Gimbrone M.A., Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**: 84 (1987) 9238-9242.
- 30 von Asmuth E.J., Smeets E.F., Ginsel L.A., Onderwater J.J.M., Leeuwenberg J.F.M., Buurmann W.A., Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells. **Eur. J. Immunol.**: 22 (1992) 2519-2526.
- 31 Kuijpers T.W., Raleigh, M., Kavanagh T., Janssen H., Calafat J., Roos D., Harlan J.M., Zytokine-activated endothelial cells internalize E-selectin into a lysosomal compartment of vasiculotubular shape: A tubulin driven Process. **J. Immunol.**: 152 (1994) 5060-5069.
- 32 Bevilacqua M.P., Stengelin S., Gimbrone M.A., Jr., Seed B., Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. **Science**: 243 (1989) 1160-1165.
- 33 Laudanna C., Constantin G., Baron P., Scarpini E., Scarlato G., Cabrini G., Dehecchi C., Rossi F., Cassatella M.A., Berton G., Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. **J. Biol.**

-
- Chem.*: 269 (1994) 4021-4026.
- 34 Wadell T.K., Fialkow L., Chan C.K., Kishimoto T.K., Downy G.P., Signaling functions of L-selectin. Enhancement of tyrosin phosphorylation and activation of MAP kinase. *J. Biol. Chem.*: 270 (1995) 15403-15411.
- 35 Kansas G.S., Ley K., Munro J.M., Tedder T.F., Regulation of leukocyte rolling and adhesion to high endothelial venules through the cytoplasmic domain of L-selectin. *J. Exp. Med.*: 177 (1993) 833-838.
- 36 Crockett Torabi E., Sulenbarger B., Smith C.W., Fantone J.C., Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J. Immunol.*: 154 (1995) 2291-2302.
- 37 Malhotra R., Priest R., Bird M.I., Role for L-selectin lipopolysaccharide-induced activation of neutrophils. *Biochem. J.*: 320 (1996) 589-593.
- 38 Malhotra R., Taylor N.R., Bird M.I., Anionic phospholipids bind to L-selectin (but not E-selectin) at a site distinct from the carbohydrate-binding site. *Biochem. J.*: 314 (1996) 297-303.
- 39 Kaplansky G., Farnarier C., Benoliel A.-M., Foa C., Kaplansky S., Bongrad P., A novel role for E- and P-selectins: shape control of endothelial cell monolayers. *J. Cell Sci.*: 107 (1994) 2449-2457.
- 40 Yoshida M., Westlin W.F., Wabg N., Ingber D.E., Rosenzweig A., Resnick N., Gimbrone M.A., Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.*: 133 (1996) 445-455.
- 41 Crovello C.S., Furie B.C., Furie B., Rapid phosphorylation and selective dephosphorylation of P-selectin accompanies platelet activation. *J. Biol. Chem.*: 268 (1993) 14590-14593.
- 42 Crovello C.S., Furie B.C., Furie B., Histidine phosphorylation of P-selectin upon stimulation of human platelets: a novel pathway for activation-dependent signal transduction. *Cell*: 82 (1995) 279-286.
- 43 Elstad M.R., Lapine T.R., Cowley F.S., McEver R.P., McIntyre T.M., Prescott S.M., Zimmermann G.A., P-selectin regulates platelet-activating factor synthesis and phagocytosis by monocytes. *J. Immunol.*: 155 (1995) 2109-2122.
- 44 Lorant D.E., Topham M.K., Whatley R.E., McEver R.P., McIntyre T.M., Prescott S.M., Zimmermann G.A., Inflammatory roles of P-selectin. *J. Clin. Invest.*: 92 (1993) 559-570.
- 45 Feizi T., Demonstration by monoclonal Antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature*: 314 (1985) 53-57.
- 46 Varki A., Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 91 (1994) 7390-7397.
- 47 Berg E.L., Magnani J., Warnock R.A., Robinson M.K., Butcher E.C., Comparison of L-selectin and E-selectin ligand specificities: the L-selectin can bind the E-selectin ligands sialyl Le^x and sialyl Le^a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: 184 (1992) 1048-1055.
- 48 Berg E.L., Robinson M.K., Mansson O., Butcher E.C., Magnani L., A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and Le(x) is recognized by endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J. Biol. Chem.*: 266 (1991) 14869-14872.
- 49 Etzioni A., Frydman M., Pollak S., Avidor I., Phillips M.L., Paulson J.C., Gershoni-

-
- Baruch R., Recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *New Engl. J. Med.*: 327 (1993) 1789-1792.
- 50 Moore K.L., Stultz N.L., Diaz S., Smith D.F., Cummings R.D., Varki A., McEver R.P., Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell Biol.*: 118 (1992) 445-456.
- 51 Sako D., Chang X.-J., Barone K.M., Vachino G., White H.M., Shaw G., Veldman G.M., Bean K.M., Ahern T.J., Furie B., Cumming D.A., Larsen G.R., Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell*: 75 (1993) 1179-1186.
- 52 Vachino G., Chang X.-J., Veldman G.M., Kumar R., Sako D., Fouser L.A., Berndt M.C., Cumming D.A., P-selectin glycolipid ligand-1 is the major counter receptor for P-selectin on stimulated T-cells and is widely distributed in non-functional form on many lymphocytic cells. *J. Biol. Chem.*: 270 (1995) 21966-21974.
- 53 Asa D., Raycroft L., Ma L., Aeed P.A., Kaytes P.S., Elhammer A.P., Geng J.G., The P-selectin glycoprotein ligand functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectin. *J. Biol. Chem.*: 270 (1995) 11662-11679.
- 54 Goetz D.J., Greif D.M., Ding H., Camphausen R.T., Howes S., Comess K.M., Snapp K.R., Kansas G.S., Luskinskas F.W., Isolated P-selectin glycoprotein ligand-1 dynamic adhesion to P- and E-selectin. *J. Cell Biol.*: 137 (1997) 509-519.
- 55 Lenter M., Levinovitz A., Isenmann S., Vestweber D., Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells. *J. Cell Biol.*: 125 (1994) 471-481.
- 56 Patel K.D., Moore K.L., Nollert M.U., McEver R.P., Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow conditions. *J. Clin. Invest.*: 96 (1995) 1887-1896.
- 57 Alon R., Fuhlbrigge R.C., Finger E.B., Springer T.A., Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow. *J. Cell Biol.*: 135 (1996) 849-865.
- 58 Spertini O., Corday A.S., Monai N., Giuffre L., Schapira M., P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes and CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J. Cell Biol.*: 135 (1996) 523-531.
- 59 Moore K.L., Patel K.D., Bruehl R.E., Li L., Johnson D.A., Lichenstein H.S., Cummings R.D., Bainton D.F., McEver R.P., P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J. Cell Biol.*: 128 (1995) 661-667.
- 60 Norman K.E., Moore K.L., McEver R.P., Ley K., Leukocyte rolling *in-vivo* is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood*: 86 (1995) 4417-4421.
- 61 Borges E., Eytner R., Moll T., Steegmaier M., Matthew A., Campbell P., Ley K., Mossmann H., Vestweber D., The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum. *Blood*: 90 (1997) 1934-1942.
- 62 Lenter M., Levinovitz A., Isenmann S., Vestweber D., Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells. *J. Cell. Biol.*: 125 (1994) 471-481.
- 63 Pouyani T., Seed B., PSGL-1 recognition is controlled by tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell*: 83 (1995) 333-343.
- 64 Sako D., Comess K.M., Barone K.M., Camphausen R.T., Cumming D.A., Shaw G.D.,

-
- A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell*: 83 (1995) 323-331.
- 65 Wilkins P.P., Moore K.L., McEver R.P., Cummings R.D., Tyrosin sulfation of glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to P-selectin. *J. Biol. Chem.*: 270 (1995) 22677-22680.
- 66 Li F., Wilkins P.P., Crawley S., Weinstein J., Cummings R.D., McEver R.P., Post-translational modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin. *J. Biol. Chem.*: 271 (1996) 3255-3264.
- 67 Norgard K.E., Moore K.L., Diaz S., Stulz N.L., Ushiyama R.P., McEver R.P., Cummings R.D., Varki A., Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells: a minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*: 268 (1993) 12764-12774.
- 68 Wilkins P.P., McEver R.P., Cummings R.D., Structures of the O-glycans on P-selectin glycoprotein ligand-1 from HL60 cells. *J. Biol. Chem.*: 271 (1996) 18732-18742.
- 69 Phillips M.L., Nudelman E.D., Gaeta F.C.A., Perez M., Singahl A.K., Hakomori S., Paulson J.C., ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Le^x. *Science*: 250 (1990) 1130-1132.
- 70 Buerke M., Weyrich A.S., Murohara T., Queen C., Klingbeil C.K., Co M.S., Lefer A.M., Humanized monoclonal antibody DREG-200 directed against L-selectin protects in feline myocardial reperfusion injury. *J. Pharmacol Exp.*: 271 (1994) 134-142.
- 71 Walz G., Aruffo A., Kolanus W., Bevilacqua M.P., Seed B., Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Le^x determinant on myeloid and tumor cells. *Science*: 250 (1990) 1132-1135.
- 72 Steegmaier M., Levinovitz A., Isenmann S., Borges E., Lenter M., Kocher H.P., Kleuser B., Vestweber D., The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*: 373 (1995) 615-620.
- 73 Picker L.J., Warnock R.A., Burns A.R., Doerschuk C.M., Berg E.I., Butcher E.C., The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell*: 66 (1991) 921-933.
- 74 Brustein M., Kraal G., Mebius R.E., Watson S.R., Identification of a soluble form of a ligand for the lymphocyte homing. *J. Exp. Med.*: 176(5) (1992) 1415-1419.
- 75 Baumhater S., Singer M.S., Henzel W., Hemmerich S., Renz M., Rosen S.D., Lasky L.A., Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science*: 262 (1993) 436-438.
- 76 Bargatze R.F., Jutila M.A., Butcher E.C., Distinct roles of L-selectin and integrins $\alpha_4\beta_7$ and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's Patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity*: 3 (1995) 99-108.
- 77 Berg E.L., McEvoy L.M., Berlin C., Bargatze R.F., Butcher E.C., L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature*: 366 (1993) 695-698.
- 78 Briskin M.K., McEvoy L.M., Butcher E.C., MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. *Nature*: 363 (1993) 461-464.
- 79 Norgard-Sumnicht K.E., Varki N.M., Varki A., Calcium dependent heparin-like ligands for L-selectin in nonlymphoid endothelial cells. *Science*: 261 (1993) 480-483.
- 80 Bargatze R.F., Kurk S., Butcher E.C., Jutila M.A., Neutrophils roll on adherent

-
- neutrophils bound to cytokine induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J. Exp Med.*: 180 (1994) 1785-1792.
- 81 Jacob G.C., Kirmaier C., Abbas S.Z., Howard S.C., Steininger C.N., Welply J.K., Scudder P., Binding of the Sialyl Lewis X to E-selectin as measured by fluorescence polarization. *Biochemistry*: 34 (1995), 1210-1217.
- 82 Thoma G., Kinzy W., Bruns C., Patton J.T., Magnani J.L., Banteli R., Synthesis and biological evaluation of a potent E-selectin antagonist. *J. Med. Chem.*: 42 (23) (1999) 4909-4913.
- 83 Steegmaier M., Borges E., Berger J., Schwarz H., Vestweber D., The E-Selectin Ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J. Cell Sci.*: 110 (1997) 687-694.
- 84 Bruehl R.E., Springer T.A., Bainton D.F., Quantitation of L-Selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*: 44 (1996) 835-844.
- 85 Bruehl R.E., Moore K.L., Lorant D.E., Borregaard N., Zimmerman G.A., McEver R.P., Bainton D.F., Leukocyte activation induces surface redistribution of P-Selectin Glycoprotein Ligand-1. *J. Leukocyte Biol.*: 61 (1997) 489-499.
- 86 Ley K., Zakrzewicz A., Hanski C., Stoolman L.M., Kansas G.S., Sialylated O-glycans and L-selectin sequentially mediate myeloid cell rolling *in-vivo*. *Blood*: 85 (1995) 3727-3735.
- 87 Ley K., Granulocyte adhesion to microvascular and cultured endothelium. *Studia Biophys.*: 134 (1989) 179-184.
- 88 Ley K., Tedder T.F., Leukocyte interactions with vascular endothelium: New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J. Immunol.*: 155 (1995) 525-528
- 89 Chien S., Usami S., Skalak R., Blood flow in small tubes. The Cardiovascular system, Microcirculation. *Handbook of physiology; MD Am. Physiol Soc.*: (1984) 217-249.
- 90 Renemann R.S., Woldhuis B., oudeEgbrink, M.G.A., Slaaf D.W., Tangelder G.J., Concentration and velocity profiles of blood cells in the microcirculation. Advances of cardiovascular engineering. *New York: Plenum Press*: (1992) 25-40.
- 91 Goldsmith H.L., Spain S., Margination of leukocytes in blood flow through small tubes. *Microvasc. Res.*: 27 (1984) 204-222.
- 92 Schmid-Schönbein G.W., Usami S., Skalak R., Chien S., The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. *Microvasc. Res.*: 19 (1980) 45-70.
- 93 Nobis U., Pries A.R., Cokelet G.R., Gaehtgens P., Radial distribution of white cells during blood flow in small tubes. *Microvasc. Res.*: 29 (1985) 295-304.
- 94 Chien S., Rheology in the microcirculation in normal and low flow states. *Adv. Shock Res.*: 8 (1982) 71-80.
- 95 Zweifach B.W., The microcirculation in the intestinal mesentery. *Microvasc. Res.*: 5 (1973) 363-367.
- 96 Duling B.R., The preparation and use of the hamster cheek pouch for studies of the microcirculation. *Microvasc. Res.*: 5 (1973) 423-429.
- 97 Schmidt E.E., MacDonald I.C., Groom A.C., Interactions of leukocytes with vessel walls and with other blood cells, studied by high-resolution intravital videomicroscopy of spleen. *Microvasc. Res.*: 40 (1990) 99-117.

-
- 98 Ensrich B., Asaishi K., Goetz A., Messmer K., Technical report - A new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res. Exp. Med.*: 177 (1980) 125-134.
- 99 Nolte D., Schmid P., Jäger U., Botzlar A., Roesken F., Hecht R., Uhl E., Messmer K., Vestweber D., Leukocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. *Am. J. Physiol.*: 267 (1994) H1637-H1642.
- 100 Wiedemann M.P., Preparation of the bat wing for in-vivo microscopy. *Microvasc. Res.*: 5 (1973) 417-422.
- 101 Mayrovitz H.N., Leukocyte rolling: A prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice. *Am. J. Physiol.*: 262 (1992) H157-H161.
- 102 Firell J.C., Lipowsky H.H., Leukocyte migration and deformation in mesenteric venules of rat. *Am. J. Physiol.*: 256 (1989) H1667-H1674.
- 103 Damiano E.R., Westheider J., Tözeren A., Ley K., Variation of velocity, deformation and adhesion energy density of leukocytes rolling in venules. *Circulation Research*: 79(6) (1997) 1122-1130.
- 104 Ley K., Gahtgens P., Endothelial, not hemodynamic differences are responsible for preferential leukocyte rolling in venules. *Circ. Res.*: 69 (1991) 1034-1041.
- 105 Atherton A., Born G.V.R., Relationship between the velocity of rolling granulocytes and that of the blood flow in venules. *J. Physiol. (London)*: 233 (1973) 157-165.
- 106 Bienvenu K., Granger D.N., Molecular determinants of shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules. *Am. J. Physiol.*: 264 (1993) H1504-H1508.
- 107 Gaboury J.P., Anderson D.C., Kubes P., Molecular mechanisms involved in superoxide-induced leukocyte-endothelial cell interactions *in-vivo*. *Am. J. Physiol.*: 266 (1994) H637-H642.
- 108 Perry M.A., Granger D.N., Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. *J-Clin-Invest.*: 87(5) (1991) 1798-804.
- 109 Olofsson A., Arfors K.E., Ramezani L., Wolitzky B.A., Butcher E.C., von Adrian U.H., E-Selectin mediates leukocyte rolling in interleukin-1-treated rabbit mesentery venules. *Blood*: 84 (1994) 2749-2758.
- 110 Dore M., Korhous R.J., Granger D.N., Entman M.L., Smith C.W., P-Selectin mediates spontaneous leukocyte rolling *in-vivo*. *Blood*: 82 (1993) 1308-1316.
- 111 Arbones M.L., Ord D.C., Ley K., Ratech H., Maynard-Curry C., Otten G., Capon D.J., Tedder D.F., Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-Selectin-deficient mice. *Immunity*: 1 (1994) 247-260.
- 112 Mayadas T.N., Johnson R.C., Rayburn H., Hynes R.O., Wagner D.D., Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-Selectin-deficient mice. *Cell*: 74 (1993) 541-554.
- 113 Kunkel E.J., Ley K., Distinct phenotype of E-Selectin-deficient mice: E-Selectin is required for slow leukocyte rolling *in-vivo*. *Circ. Res.*: 79 (1996) 1196-1204.
- 114 Milstone D.S., Fukumura D., Padgett R.C., O'Donnell P.E., Davis V.M., Benavidez O.J., Monsky W.L., Melder R.J., Jain R.K., Gimbrone M.A., Mice lacking E-Selectin show normal numbers of rolling leukocytes but reduced leukocyte stable arrest on cytokine-activated microvascular endothelium. *Microcirculation*: 5 (1998), 153-171.
- 115 Bullard D.C., Beaudet A.L., Analysis of selectin deficient mice. In: The Selectins. D.

-
- Vestweber (Ed.). *Harwood Academic Press, Amsterdam*: (1997) 133-142.
- 116 Lawrence M.B., Springer T.A., Leukocytes roll on Selectin at physiologic flow rates: Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*: 65 (1991) 859-873.
- 117 Lawrence M.B., Springer T.A., Neutrophils roll on E-Selectin. *J. Immunol.*: 151 (1993) 6338-6346.
- 118 Puri K.D., Finger E.B., Springer T.A., The faster kinetic of L-Selectin than of E-Selectin and P-Selectin rolling at comparable binding strength. *J. Immunol.*: 158 (1997) 405-413.
- 119 Alon R., Hammer D.A., Springer T.A., Lifetime of the P-Selectin carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature*: 374 (1995) 539-542.
- 120 Fritz J., Katapodis A.G., Kolbinger F., Anselmetti D., Force-mediated kinetics of single P-Selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 95 (1998) 12283-12288.
- 121 Patel K.D., Nollert M.U., McEver R.P., P-Selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils. *J. Cell Biol.*: 131 (1995) 1893-1902.
- 122 Müthing J. High-resolution thin-layer chromatography of gangliocytes. *J. of Chromatogr. A*: 720 (1996) 3-25.
- 123 Müthing J., Kemminer S.E., Nondestructive detection of neutral glycosphingolipids with lipophilic anionic fluorochromes and their employment for preparative high performance thin-layer chromatography. *Analyt. Biochem.*: 238 (1996) 195-202.
- 124 Gege Ch., Vogel J., Bendas G., Rothe R. Schmidt R.R., Synthesis of the Sialyl Lewis X epitope attached to glycolipids with different core structures and their selectin-binding characteristics in a dynamic test system. *Chemistry A Europ. J.*: 6 No. 1 (2000) 111-122.
- 125 Hummel G., Schmidt R.R., A versatile synthesis of the lactoneo-series antigen-Synthesis of the Sialyl dimer Lewis X and Dimer Lewis Y. *Tetrahedron Lett.*: 38 (1997) 1173-1176.
- 126 Binnig G., Quate C.F. und Gerber C., Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.*: 56 (1986) 930.
- 127 Hansma H.G., Hoh J.H., Biomolecular Imaging with the Atomic Force Microscope. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc.*: 23 (1994) 115 - 139.
- 128 Martini T., Diplomarbeit, *Dissertation Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg* (1993).
- 129 Hochmuth R.M., Mohandas N., Blachschar P.L., Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys. J.*: 13 (1973) 747-762.
- 130 Baumgartner, H.R., The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of mural thrombi. *Microvasc. Res.*: 5 (1973) 618-627.
- 131 Lawrence M.B., McIntire L.V., Eskin S.G., Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion. *Blood*: 70 (1987) 1284-1290.
- 132 Wattenbarger M.R., Graves D.J., Lauffenburger D.A., Specific adhesion of glycophorin liposomes to a lectin surface in shear flow. *Biophys. J.*: 57 (1990) 765-777.

-
- 133 Tissot O., Pierres A., Foa C., Delaage M., Bongrand P., Motion of cells sedimenting of a solid surface in a laminar shear flow. *Biophys. J.*: 58 (1992) 641-652.
- 134 Ohlsson P.A., Tjärnhage T., Herbai E., Lofas S., Puu G., Liposome and proteoliposome fusion onto solid substrates, studied using atomic force microscopy, quartz crystal microbalance and surface plasmon resonance: Biological activities of incorporated components. *Bioelectrochem. and Bioenerg*: 38 (1) (1995) 137-148.
- 135 Tamm L.K., McConnell H.M., Supported phospholipid bilayers. *Biophys. J.*: 47 (1985) 105-113.
- 136 Gaines G.L., Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces. *Interscience Publishers, New York*, (1966).
- 137 Bakowsky U., Herstellung, Funktionalisierung und physikochemische Charakterisierung von substratgestützten Oberflächenschichten. *Dissertation Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg*: (1998).
- 138 Lewis S.D., Shafer J.A., Goldstein I.J., Kinetic parameters for the binding of p-Nitrophenyl α -D-Mannopyranoside to Concanavalin A. *Arch. Biochem. Biophys.*: 172 (1976) 689-695.
- 139 Bendas G., Vogel J., Bakowsky U., Krause A., Müller J., Rothe U., A liposome-based model system for the simulation of lectin-induced cell adhesion. *Biochim. Biophys. Acta*: 1325 (1997) 297-308.
- 140 Bendas G., Beiträge zu neuartigen antiinflammatorischen Therapieansätzen durch die pharmazeutische Ausnutzung von Selektinen. *Habilitation Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg*: (2000) in Vorbereitung.
- 141 Symington F.W., Hedges D.L., Hakamori S.I., Glycolipid antigens of human polymorphonuclear neutrophils and the inducible HL-60 myeloid leukemia line. *J. Immunol.*: 134 (1985) 2498-2506.
- 142 Vogel J., Bendas G., Bakowsky U., Hummel G., Schmidt R.R., Kettmann U., Rothe U. The role of glycolipids in mediating cell adhesion: A flow chamber study. *Biochim. Biophys. Acta*: 1372 (1998) 205-215.
- 143 Ikami T., Kakigami T., Baba K., Hamajima H., Jomori T., Usui T., Suzuki Y., Tanaka H., Ishida H., Hasegawa A., Kiso M., Synthetic studies on selectin ligands/inhibitors: Synthesis and inhibitory activity of 2-O-Fucosyl sulfatides containing 2-branched fatty alkyl residues in place of ceramide. *J. Carbohydrate Chem.*: 17 (1998) 453-470.
- 144 Ikami T., Tomiya N., Morimoto T., Iwata N., Yamashita R., Jomori T., Usui T., Suzuki Y., Tanaka H., Miyamoto D., Ishida H., Hasegawa A., Kiso M., Synthetic studies on selectin ligands/inhibitors: Synthesis and biological activity of the sulfated and phosphorylated multivalent β -D-Galactopyranosides containing fatty alkyl residues. *J. Carbohydrate Chem.*: 17 (1998) 499-518.
- 145 Ikami T., Tsuruta N., Inagaki H., Kakigami T., Matsumoto Y., Tomiya N., Jomori T., Usui T., Suzuki Y., Tanaka H., Miyamoto D., Ishida H., Hasegawa A., Kiso M.: Synthetic studies on selectin ligands/inhibitors: Synthesis and biological evaluation of sulfated and phosphorylated β -D-Galacto- and Lactopyranosides containing fatty alkyl residues of different carbon chain length. *Chem. Pharm. Bull.*: 46 (1998) 797-806.
- 146 Hiramatsu Y., Tsujishita H., Kondo H., Studies on selectin blockers 3: Investigation of the carbohydrate ligand of Sialyl Lewis ^x recognition site of P-Selectin. *J. Med. Chem.*: 39 (1996) 4547-4553.

-
- 147 Moore K. L., Varki A., McEver R. P., GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils: Evidence for a lectin-like interaction. *J. Cell Biol.*: 112 (1991) 491-499.
- 148 Storm G., Vingerhoeds M.H., Crommelin D.J.A., Haisma H.J., Immunoliposomes bearing enzymes (Immunoenzymosomes) for site-specific activation of anticancer prodrugs. *Adv. Drug Del. Rev.*: 24 (1997) 225-231.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsittel nicht benutzt und die in den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich emacht habe.

Halle, Juni 2000

Lebenslauf

Name Jan Vogel
Geburtsdatum 20. 06.1967
Geburtsort Mittweida
Familienstand ledig, keine Kinder

Zeitraum	Tätigkeit	Abschlußprädikat
1974-1984	Polytechnische Oberschule Mittweida	sehr gut
1984-1986	Erweiterte Oberschule Frankenberg	sehr gut
1986-1989	Militärdienst	
1989-1993	Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg	
Okt. 1991	1. Staatsexamen nach Approbationsordnung	gut
Aug. 1993	2. Staatsexamen nach Approbationsordnung	sehr gut
Okt.-Mrz. 1994	Pharmaziepraktikum in einer öffentlichen Apotheke	
Apr.-Spt. 1994	Erarbeitung einer Diplomarbeit im Bereich Drug Delivery Systems bei der SANDOZ Pharma AG Basel	sehr gut
18. Okt. 1994	3. Staatsexamen, Approbation als Apotheker	
seit März 1995	Stipendiat nach Graduiertenförderungs- gesetz des Landes Sachsen-Anhalt; wiss. Mitarbeiter der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Pharmazie	

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Prof. Dr. habil. P. Nuhn für die Überlassung der interessanten Thematik sowie für die gewährte Unterstützung, Förderung und Freiheit bei der Bearbeitung des Themas am Institut für Pharmazeutische Chemie.

Zu außerordentlichem Dank bin ich gleichermaßen Herrn Dr. G. Bendas und Herrn PD Dr. habil. U. Rothe verpflichtet, unter deren Anleitung ich die Arbeiten im Rahmen des SFB 197 durchführen konnte. In einer vertrauensvollen und freundschaftlichen Zusammenarbeit konnten sie mir durch ihre Kreativität und Kritik wertvolle Erfahrungen vermitteln und damit wissenschaftliches Denken fordern und fördern.

Großer Dank gilt Herrn Dr. U. Bakowsky für seine Unterstützung und für die anregenden Diskussionen bei der Bearbeitung physikochemischer Problemstellungen und der Anfertigung von fluoreszenzmikroskopischen und AFM-Aufnahmen. Herrn Dr. H. Aurich danke ich für die Einführung am CLSM und der dazugehörigen rechnergestützten Auswertungsmethoden. Ich danke Frau A. Krause, Herrn V. Oberle und Herrn M. Bandulik für die ständige Diskussionsbereitschaft und die ausgezeichnete Zusammenarbeit. Für ein angenehmes Arbeitsklima und kollegiale Zusammenarbeit danke ich meinen Laborkollegen Herrn Dr. A. Engel, Herrn A. Al-Arifi, Frau G. Schumacher, Frau H. Bakowsky und Herrn L. Tao. Besonders bedanke ich mich bei Frau J. Petters, die durch ihre Unterstützung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke Frau U. Goder für ihre mikrobiologischen Zuarbeiten. Mit ihren Erfahrungen war sie eine große Hilfe bei allen Zelluntersuchungen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Richard R. Schmidt, Fachbereich Chemie der Universität Konstanz sowie seinem Doktoranden Herrn Ch. Gege für die Bereitstellung der synthetischen Glykolipide.

Ich danke dem Land Sachsen-Anhalt für die Unterstützung in Form eines Stipendiums im Rahmen der Graduiertenförderung.

Diese Arbeit wurde teilweise im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 197 angefertigt. Deshalb danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung und Ausstattung sehr herzlich.